

UNIVERSIDAD DE SONORA

UNIDAD REGIONAL NORTE

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

“Determinación del Estado Antioxidante Total en Personas con Diabetes Mellitus Tipo 2 del Grupo de Ayuda Mutua la Esperanza del Mañana del Centro de Salud Rural de H. Caborca, Sonora en un Periodo Comprendido de Octubre de 2009 a

Febrero de 2010”

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO

Especialidad Análisis Clínicos

Presenta

1942

FRANCISCA GUADALUPE REYNA DURÁN

H. CABORCA, SONORA

JUNIO 2016

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias de la División de Ciencias e Ingeniería de la Unidad Regional Norte Campus Caborca de la Universidad de Sonora. Se contó con apoyo interno.

APROBACIÓN

Los miembros del Comité designados para evaluar la tesis de Francisca Guadalupe Reyna Durán, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener su Licenciatura de Químico Biólogo.

M.C. Ramón Efraín Lugo Sepúlveda.
Presidente

Dr. Juan Antonio Noriega Rodríguez
Secretario

Q.B. Ana Laura Villa Reyna
Vocal

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente, por haberme permitido llegar hasta este punto y darme salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor, por haberme puesto en mi camino a esta familia que ha sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio y elaboración de mi tesis.

A la Universidad de Sonora por abrirme sus puertas y permitirme ser parte de su alumnado, por ser parte importante de mi formación profesional.

Un especial agradecimiento a mi director de tesis el M.C. Ramón Efraín Lugo Sepúlveda por su gran ayuda, apoyo, interés y sobre todo por su paciencia durante el desarrollo de esta tesis profesional.

Al Dr. Juan Antonio Noriega Rodríguez, por su colaboración en la parte estadística de esta investigación.

A la Q.B. Ana Laura Villa Reyna y por su valioso apoyo, observaciones y sugerencias para mejorar la calidad del presente trabajo y formar parte del comité revisor.

A todos los profesores y profesoras que formaron parte tanto de mi formación profesional como personal por compartirme sus conocimientos y brindarme siempre su apoyo durante toda mi carrera profesional.

DEDICATORIA

A mis padres, Héctor Manuel Reyna Bejarano y María Reyna Durán Ríos, por darme la vida, quererme mucho, creer en mí y porque siempre me apoyaron. Gracias por darme una carrera profesional para mi futuro, todo esto se los debo a ustedes. Por ser el pilar fundamental de todo lo que soy, en toda mi educación tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo. Papy aunque tú ya no estás con nosotros te doy las gracias hasta donde te encuentres.

Al gran amor de mi vida, mi esposo, Gerardo García, gracias mi amor por tu compañía, paciencia, comprensión, apoyo incondicional, por tus traducciones, por estar siempre ahí dándome ánimos, gracias mi niño hermoso, te amo.

A mi hermoso hijo Gabriel García que se ha convertido en mi razón de vivir, en la luz que me impulsa y me hace fuerte para seguir adelante.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE	i
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
TABLA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	5
2.1 Objetivo General	5
2.2 Objetivos Específicos	5
3. ANTECEDENTES	6
3.1 Producción de Radicales Libres en Seres Vivos	7
3.1.1 Producción de Radicales Libres por la Mitocondria	7
3.1.1.1 Fuentes Biológicas de Radicales Libres	7
3.1.1.2 Participación de la Mitocondria en el Estrés Oxidativo	8
3.1.1.3 Sistemas Antioxidantes Mitocondriales	11
3.1.2 Especies Reactivas del Oxígeno	13
3.1.3 Formación de Radicales Libres y Especies Reactivas de Oxígeno	14
3.1.4 Sustancias que pueden modificar los niveles de Radicales Libres	14
3.1.5 Reacciones de Óxido-Reducción y la aparición de los EROs	15
3.1.6 Daño Oxidativo a los Principales Componentes de la Célula	16
3.1.7 Sistema de Defensa Contra los EROs	17
3.2 Estrés Oxidativo	20

3.3	Diabetes mellitus	22
3.3.1	Impacto Social de la Diabetes mellitus	24
3.3.2	Aspectos Históricos de la Diabetes Mellitus	25
3.3.2.1	Participación de la Mitocondria en la Enfermedad	25
3.4	Evidencias de Diabetes y Estrés Oxidativo	26
3.4.1	Cómo el Estrés Oxidativo Causa Daño a los Diabéticos	27
3.5	Neuropatía Diabética	28
3.5.1	Importancia de los Radicales Libres en Algunas	29
Patologías		
3.5.1.1	Patología del Sistema Nervioso	29
3.5.1.2	Procesos Tumorales	30
3.5.1.3	Diabetes	30
3.5.1.4	Cataratas	31
3.5.1.5	Síndrome de Down	31
3.5.2	Síndromes, Enfermedades y Procesos Degenerativos	32
que se consideran Relacionados con el Estrés Oxidativo		
3.6	La Defensa Antioxidante y su Relación con Diferentes	33
Enfermedades		
3.7	La Suplementación de la Dieta con Antioxidantes	34
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	35
4.1	Material Biológico	35
4.2	Toma de Muestra	36
4.3	Determinación del Estado Antioxidante Total (TAS)	37
4.4	Procedimiento para el Análisis	38
4.5	Grupo Control	40
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
5.1	Análisis de resultados	

5.2	Característica de la muestra	43
5.3	Análisis de antioxidantes totales (AOT)	46
5.4	Efecto del sexo sobre la Cantidad de AOT	49
5.5	Efecto de la edad sobre El contenido de AOT	50
5.6	Comparación de medias	53
5.7	Efecto del Sexo y la edad en el contenido de AOT	56
6.	CONCLUSIONES	60
7.	RECOMENDACIONES	62
8.	BIBLIOGRAFÍA	63
9.	ANEXOS	66
9.1	Preparación de reactivos	66
9.2	Preparación del suero control	67
9.3	Reactivos	68
9.4	Procedimiento	69
9.5	Entrevista realizada al grupo de estudio	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
A	Total de pacientes por sexo y edad	41
B	Grupo control agrupado por edad y resultados	42
1	Grupo control agrupado por edad y resultados	54
2	Resultados de la prueba de medias con el control de Dunnett	56
3	Reactivos del kit TAS Antioxidantes Totales	68
4	Procedimiento del análisis	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		
1	Diagrama de frecuencia de edades en la muestra de personas del grupo control.	44
2	Histograma de frecuencia de edades en los pacientes control	45
3	Resultados del análisis de antioxidantes totales en pacientes	47
4	Resultados del análisis de antioxidantes totales en los controles	48
5	Prueba de medias entre la cantidad de AOT para los generos analizados	49
6A	Relación del contenido de AOT con la edad	51
6B	Correlacion de la edad contra el I_{ox} de todos los controles	52
7	Índice oxidativo como una función de la edad	53
8	Comparación de medias Dunnet con los valores control	55
9A	Prueba de medias apareadas en hombres AOT/EDAD	57
9B	Prueba de medias apareadas en mujeres AOT/EDAD	58

10	Distribución de los errores entre los valores predichos y los resultados analíticos de AOT	59
-----------	-----------------------------------------------------------------------------------------------	----

TABLA DE ABREVIATURAS

ABTS ^R	(2,2-azino-di [3-etilbenzotiazolin sulfonato])
ADA	American Diabetes Association [®]
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGE	Advanced Glicosilation Endproducts
ATP	Adenosin trifosfato
CAT	Catalasas
CRM	Cadena Respiratoria Mitocondrial
DM	Diabetes Mellitus
DMNID	Diabetes mellitus No Insulinodependiente
EO	Estrés Oxidativo
EOx	Estrés oxidativo
ER	Especies Reactivas
ERO	Especie Reactiva del Oxígeno
EROs	Especies Reactivas del Oxígeno
ESC	Exámenes Sensoriales Cuantitativos
GPx	Glutación Peroxidasa
GR	Glutación Reducasa

GSH	Glutación Reducido
GSSG	Glutación Oxidado
HOCl	Ión hipoclorito
H ₂ O	Óxido de Hidrógeno
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
LPO	Lipoperóxidos
MDA	Malondialdehido
MPO	Mieloperoxidasa
NADPH	Nicotinamidaadenina dinucleótido fosfato reducido
ND	Neuropatía Diabética
NFL	Neuropatía de Fibras Largas
NFP	Neuropatía de Fibras Pequeñas
NO	Óxido Nítrico
¹ O ₂	Oxígeno Singlete
O ₂ ⁻	Anión Superóxido
OH [·]	Radical Hidroxilo
OH ⁻	Ión Oxidrilo

OONO \cdot	Peroxinitrito
PSD	Polineuropatía Simétrica Difusa
RL	Radical Libre
RLO	Radical Libre de Oxígeno
RO \cdot	Alcoxil
ROO \cdot	Peroxil
SOD	Superóxido Dismutasa
SODm	Superóxido Dismutasa mitocondrial
TAS	Estado Antioxidante Total

RESUMEN

El desbalance en la producción de especies reactivas del oxígeno y la defensa antioxidante, provoca un tipo de daño en el organismo conocido como estrés oxidativo, que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos, los cuales provocan el deterioro y la muerte celular. Se puede medir este tipo de daño mediante métodos directos e indirectos. La implicación del estrés oxidativo en diversas patologías ha sido demostrada; entre ellas se encuentra la diabetes mellitus. El estrés oxidativo aparece en células y tejidos, cuando existe descontrol en el equilibrio entre las sustancias prooxidantes y antioxidantes. La hiperglucemia constituye la principal manifestación de la diabetes mellitus y está implicada en la aparición de las complicaciones que se presentan asociadas con la enfermedad, con la aparición de esta patología, se ha demostrado que altos valores de glicemia conducen a un estado de estrés oxidativo.

El presente estudio se llevó a cabo en adultos que padecen Diabetes Mellitus tipo II y que asisten al grupo de AYUDA MUTUA “La esperanza del mañana”, pertenecientes al Centro de Salud Rural de H. Caborca, Sonora, en un periodo comprendido de Octubre de 2009 a Febrero de 2010. La determinación se llevó a cabo mediante un método colorimétrico de Randox llamado TAS ANTIOXIDANTES (Totales), para lo cual se necesitó una muestra de sangre de cada uno ya que se trabajó con muestras séricas para la determinación. Se aplicó una encuesta a cada integrante del grupo, donde se indagó acerca de los antecedentes médicos personales y familiares, hábitos tales como: dieta diaria, sedentarismo, horas de ejercicio, tabaquismo, alcoholismo, síntomas, edad, nombre, etc., una vez realizada la encuesta iniciamos con la toma de muestra al primer grupo de 27 personas de ambos sexos, 3 hombres y 24 mujeres, de edades entre 41 y 77 años, todos diagnosticados con diabetes mellitus tipo 2 las muestras fueron obtenidas por

venopunción directa en tubos para muestreo sanguíneo al vacío, de tapón rojo sin anticoagulante. En la siguiente visita al mismo grupo se tomaron nuevamente muestras a 5 hombres y 10 mujeres, con edades de 43 a 77 años, por venopunción directa en tubos al vacío de tapón rojo para obtener el suero correspondiente a cada muestra sanguínea. En total se trabajaron 42 muestras problema, de las cuales fueron adultos de ambos sexos que padecen de Diabétes Mellitus tipo 2.

Para la presente investigación se utilizó un grupo control integrado por 11 personas clínicamente sanas de ambos sexos con edades de 20 a 33 años para ser analizado y comparado con el grupo de estudio, a las cuales se les tomó una muestra de sangre por venopunción directa en tubos vacutainer de tapón rojo, para la obtención de suero de cada muestra control.

El análisis se realizó mediante la técnica TAS ANTIOXIDANTES (Totales) marca Randox de 5x10 mL y el control para TAS de marca Randox, en el laboratorio de análisis Bioquímicos de la Universidad de Sonora Unidad Regional Norte Campus H. Caborca, donde se encontró que los valores del Estado Total Antioxidante en promedio, para el grupo de estudio, por sexo fue de 2.083 mmol/L en hombres y 1.993 mmol/L en mujeres, mientras que para el grupo control el valor en promedio, por sexo fue de 2.087 mmol/L en hombres y 2.144 mmol/L para mujeres, por lo tanto se observa que los valores obtenidos en el grupo de estudio son relativamente bajos comparados con el grupo control compuesto por individuos sanos y con buena alimentación, siendo el valor normal 2.085 mmol/L del Estado Total Antioxidante, el rango normal que maneja la técnica es de 1.30 a 1.77mmol/L en una población activa Europea, por lo cual recomienda que cada laboratorio establezca sus valores de referencia, ya que puede haber variaciones regionales debido por ejemplo a factores genéticos.

1. INTRODUCCIÓN

El oxígeno es esencial para la vida, pero posee una paradoja en los organismos aerobios, este elemento desempeña una función importante como aceptor terminal de electrones durante la respiración celular, y constituye lo que se conoce como el “soporte de la vida”; pero también constituye el punto de partida para un tipo de daño celular conocido como “estrés oxidativo”¹²

Un radical libre es una molécula (orgánica ó inorgánica), en general extremadamente inestable y, por tanto, con gran poder reactivo¹³. Se pueden generar pero no sintetizar en el laboratorio, formar en la atmósfera por radiación ultravioleta, y también se forman en los organismos vivos (incluido el cuerpo humano) por el contacto con el oxígeno y actúan alterando a las membranas celulares y atacando el material genético de las células, como el ADN¹³.

Los radicales libres se producen en la respiración con la presencia de oxígeno que aunque es imprescindible en la vida celular de nuestro organismo, también se producen estas moléculas reactivas, que provocan a lo largo de la vida efectos negativos para la salud debido a su capacidad de alterar el ADN (los genes), las proteínas y los lípidos o grasas ("oxidación")¹³. En nuestro cuerpo existen células que se renuevan continuamente como las células de la piel, del intestino, y otras que no como las células del hígado y las neuronas.

Aspecto Químico: Su mecanismo de generación es mediante reacciones en cadena¹².

Aspecto Bioquímico (médico): Ocasiona daño a tejidos, es un problema de salud pública¹².

En los países desarrollados, el 70% de las causas de muerte, se deben al cáncer y a enfermedades del aparato circulatorio. El 90% de estos factores son potencialmente evitables (tabaco, alcohol, dieta, contaminación ambiental). Del 75-80% de todos los casos de cáncer son inducidos por el medio ambiente y del 30-40% por la dieta¹¹.

En el transcurso de los años, los radicales libres pueden producir una alteración genética sobre las células que se dividen continuamente contribuyendo a aumentar el riesgo de cáncer por mutaciones genéticas o bien, disminuyen la funcionalidad de las células que no se dividen tanto, disminuyendo el número de mitocondrias, que es característico del envejecimiento¹³.

El estrés oxidativo es un estado que se caracteriza por un desequilibrio en la producción de especies reactivas del oxígeno y la capacidad antioxidante de las células¹⁷. Se define como el desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de especies reactivas (ER) y Radicales Libres (RL), que provocan daño oxidativo a las macromoléculas y que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes de defensa. Este daño se relaciona con el envejecimiento y con más de 100 padecimientos. El daño celular que producen las especies reactivas y los radicales libres, ocurre en los enlaces de proteínas, los fosfolípidos poliinsaturados de las membranas celulares, hidratos de carbono y ácidos nucleicos, lo que provoca gran variedad de cambios bioquímicos y fisiológicos en la célula, ocasionados por la activación de una reacción en cadena. Esto induce a que se presenten diversas enfermedades, como diabetes, aterosclerosis, procesos inflamatorios, el de isquemia/reperfusión, enfermedad de Alzheimer, Parkinson, cataratas, depresión, diversos tipos de cáncer, entre otros¹⁰.

El “estrés oxidativo” puede provenir de: una deficiencia del sistema de defensa antioxidante, un incremento de la formación de EROs, cuya alta reactividad puede provocar: peroxidación lipídica, daño de la membrana celular, rotura del ADN, degradación proteica¹².

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) se derivan del metabolismo de moléculas de oxígeno. EROs incluido el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) oxígeno singlete (1O_2), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y el altamente reactivo radical hidroxilo ($\bullet OH$)¹³.

La superóxido dismutasa (SOD), se encarga de la remoción de los radicales superóxido, producidos en la cadena de transporte electrónico mitocondrial, convirtiéndolos en peróxido de hidrógeno¹⁶.

A los mecanismos de defensa que la célula utiliza para neutralizar los EROs, se les denomina antioxidantes, y se considera como tal a cualquier sustancia que en concentraciones normales posea una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interactuar con un radical libre⁸.

El antioxidante, al colisionar con un RLO le cede un electrón, que se oxida a su vez y se transforma en un RLO débil no tóxico (la vitamina E)⁸. No todos actúan de esta forma, en el caso de las enzimas catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan substratos que a su vez reaccionan con los RLOs⁸.

Desde el aspecto clínico y genético, la diabetes mellitus (DM), constituye un grupo heterogéneo de trastornos metabólicos de carácter crónico, caracterizados por una concentración anormal elevada de glucosa en sangre. Las causas de la hiperglucemia son deficiencias en la secreción de insulina o resistencia de las células del cuerpo a la acción de ésta. La hiperglucemia constituye la principal manifestación de la diabetes mellitus y está implicada en

la aparición de las complicaciones que se presentan asociadas con la enfermedad, con la aparición de esta patología, se ha demostrado que altos valores de glicemia conducen a un estado oxidativo¹⁸.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Determinación del Estado Antioxidante Total en personas con Diabetes Mellitus Tipo 2 del grupo de ayuda mutua “La esperanza del mañana” del Centro de Salud Rural de H. Caborca, Sonora en un periodo comprendido de Octubre de 2009 a Febrero de 2010.

2.2 Objetivos Específicos

1. Hacer mención de indicadores químicos de daño oxidativo.
2. Describir la metodología para la medición de niveles de estrés oxidativo.
3. Llevar a cabo la medición de los niveles del Estado Antioxidante Total en pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 2 del grupo de ayuda mutua “La esperanza del mañana” del Centro de Salud Rural de H. Caborca, Sonora en un periodo comprendido de Octubre de 2009 a Febrero de 2010.

3. ANTECEDENTES

A partir de que en 1954 la doctora Argentina Rebeca Gerschman sugiriera por primera vez que los radicales libres eran agentes tóxicos y generadores de enfermedades, este campo de investigación estuvo confinado a la física, la química y la biología. Solo en los últimos años ha sido incorporado este tema al pensamiento clínico y son cada vez más los médicos que le prestan atención¹². La teoría de Gerschman, como fue conocida en su momento, postulaba que:

- a) Los radicales libres del Oxígeno son el mecanismo común de las toxicidades del oxígeno y de la radiación.
- b) Un aumento en la presión parcial de oxígeno o una disminución de la defensa antioxidante llevan igualmente al daño celular y tisular.
- c) La toxicidad del oxígeno es un fenómeno continuo³.

Esta teoría no fue aceptada en su momento considerando que los radicales libres eran demasiado reactivos y tóxicos para existir en los sistemas biológicos en condiciones fisiológicas. Químicamente, el oxígeno era reconocido como un oxidante y la radiación era conocida como reductora debido a los electrones producidos en la radiólisis del agua. Adicionalmente en ese tiempo, no había un reconocimiento del papel de la mujer en la ciencia³.

El oxígeno es esencial para la vida, pero posee una paradoja en los organismos aerobios. Este elemento desempeña una función importante como aceptor terminal de electrones durante la respiración celular, y constituye lo que se conoce como el "soporte de la vida"; pero también constituye el punto de partida para un tipo de daño celular conocido como "estrés oxidativo"¹².

3.1 Producción de radicales libres en seres vivos

Los radicales libres se producen en la respiración con la presencia de oxígeno que aunque es imprescindible en la vida celular de nuestro organismo, también se producen estas moléculas reactivas, que provocan a lo largo de la vida efectos negativos para la salud debido a su capacidad de alterar el ADN (los genes), las proteínas y los lípidos o grasas ("oxidación")¹³. En nuestro cuerpo existen células que se renuevan continuamente como las células de la piel, del intestino, y otras que no como las células del hígado y las neuronas. En el transcurso de los años, los radicales libres pueden producir una alteración genética sobre las células que se dividen continuamente contribuyendo a aumentar el riesgo de cáncer por mutaciones genéticas o bien, disminuyen la funcionalidad de las células que no se dividen tanto, disminuyendo el número de mitocondrias, que es característico del envejecimiento¹³.

3.1.1 Producción de Radicales Libres por la Mitocondria

3.1.1.1 Fuentes Biológicas de Radicales Libres

En la década de los años 70 Boveris y Chance descubrieron la producción mitocondrial de H_2O_2 en mitocondrias de hígado y corazón como un proceso fisiológico modulado por las condiciones energéticas de la célula. Las mitocondrias son la fuente fisiológica más importante del H_2O_2 intracelular. Estas producen H_2O_2 a velocidades que dependen del estado metabólico mitocondrial. En el estado controlado y altamente reducido, estado 4, la producción de H_2O_2 es máxima (2%), y en el estado activo y más oxidado, estado 3, la producción de H_2O_2 (0.1%) es mínima¹³.

3.1.1.2 Participación de la Mitocondria en el Desarrollo de Estrés Oxidativo

La aerobiosis significó una gran ventaja evolutiva para los organismos eucariotes debido a que los combustibles que aportan energía son oxidados al máximo, utilizando al oxígeno molecular como último aceptor de electrones, con lo cual en la mitocondria se obtiene la mayor cantidad de adenosin trifosfato (ATP), que la célula necesita, sin embargo, el oxígeno también puede resultar tóxico debido a sus propiedades oxidantes y a los productos intermedios de su metabolismo tales como radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) radical hidroxilo (OH^{\cdot}), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), entre otros; que en conjunto se conocen como especies reactivas de oxígeno (EROs) y son poderosos oxidantes que participan en el daño a biomoléculas provocando el llamado estrés oxidativo (EO)⁶.

Dentro del metabolismo celular existen numerosos sitios de generación de especies oxidantes in vivo, entre estos, cuatro son los que más atraen la atención:

- 1) Metabolismo peroxisomal de ácidos grasos, donde se forma H_2O_2 como subproducto y a pesar de que los peroxisomas contienen alta actividad de catalasa pueden provocar EO bajo ciertas condiciones patológicas⁶.
- 2) Reacciones microsomales de citocromo P450 que cataliza el metabolismo de compuestos xenobióticos por oxidorreducciones formándose $O_2^{\cdot-}$ como subproducto, lo cual puede provocar EO, aunque no está bien definido bajo qué condiciones se desarrolla⁶.
- 3) Las células fagocíticas que atacan a los patógenos invasivos con una mezcla de EROs y otros oxidantes, este mecanismo conocido como estallido respiratorio es una respuesta importante del sistema

inmunológico, pero también daña tejidos aledaños produciendo inflamación⁶.

- 4) Finalmente, la cadena respiratoria mitocondrial (CRM), cuya participación en el desarrollo de daño oxidativo es objeto de muchas investigaciones. Se considera que la mitocondria es el sitio dentro de la célula donde se genera la mayor cantidad de EROs que desencadena EO, provocando defectos en el metabolismo mitocondrial y enfermedades⁶.

La Mitocondria constituye la principal fuente de Radicales Libres. Éstos se producen a través de la cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa. Éste transporte es a través de la membrana interna Mitocondrial, donde se genera un gradiente electroquímico que aporta la energía necesaria para producir adenosin trifosfato (ATP). En éste proceso de fosforilación oxidativa el oxígeno actúa como aceptor final de electrones lo que le confiere en más del 95% de estas reacciones un total de 4 e⁻ de moléculas con producción de 2 moléculas de agua. Una consecuencia directa de este proceso es que entre los nutrientes iniciales y la generación de energía al final del proceso, se forman varias moléculas con diferente grado de oxidación. Algunas de ellas pueden entregar 1 o 2 e⁻ al oxígeno y producir intermediarios parcialmente reducidos que son los Radicales Libres.

Otra fuente son las peroxisomas, organelos del citosol muy ricos en oxidasas y que generan peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el cual es depurado por enzimas específicas (catalasas CAT) y transformado en agua. Los leucocitos polimorfonucleares son otra fuente importante, al activarse por diversas proteínas que actúan específicamente sobre ellos (complemento, interleucinas, etc.). Los leucocitos poseen en la membrana la enzima NADPH oxidasa

generadora de oxígeno, que en presencia de hierro se transforma en un potente tóxico radical oxidrilo OH^\cdot . Esta situación se da en los procesos inflamatorios.

La enzima xantina deshidrogenasa predomina en los endotelios normalmente depura las xantinas (isquemia, estimulación del Ca^{+2} , etc.) y genera anión superóxido (O_2^-).

Se puede apreciar que los RL se forman en condiciones fisiológicas en proporciones controlables por los mecanismos celulares de defensa, sin embargo, en situaciones patológicas, esta producción se incrementa y provoca el estado de Eox¹¹.

Los factores que aumentan la producción de radicales libres son:

- **Químicos:** aumento de metales pesados, xenobioticos, componentes del humo del tabaco.
- **Drogas:** Adriamicina.
- **Físicos:** Radiaciones ultravioleta, hiperoxia.
- **Orgánicos y metabólicos:** Dieta hipercalórica, dieta insuficiente en antioxidantes, diabetes, procesos inflamatorios y traumatismos, fenómenos de isquemia-reperfusión y ejercicios extenuantes¹⁶.

El desbalance en la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs) y la defensa antioxidante provoca el "estrés oxidativo" que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos, los cuales provocan el deterioro y muerte celular¹³.

El "estrés oxidativo" puede provenir de:

- Una deficiencia del sistema de defensa antioxidante.

– Un incremento de la formación de EROs, cuya alta reactividad puede provocar: peroxidación lipídica, daño de la membrana celular, rotura del ADN, degradación proteica.

El aumento de varios de estos agentes oxidantes a la vez, provoca cambios biológicos de manera progresiva en el organismo, siguiendo más o menos un patrón común y la acumulación progresiva de esos cambios ocasiona la enfermedad¹³.

3.1.1.3 Sistemas Antioxidantes Mitocondriales

Las células cuentan con una batería de defensas antioxidantes, cuya función es neutralizar la formación de ERO una vez que se han formado. Una parte importante de estas defensas se concentran en la mitocondria, clasificándose en cinco niveles⁶.

En primer lugar, cuenta con un sistema enzimático capaz de efectuar la reducción tetravalente consecutiva del oxígeno, sin liberar los intermediarios tales como O_2^- y H_2O_2 . Esto lo logra con gran eficiencia el sistema citocromo oxidasa, (el complejo IV que se encuentra en la membrana interna mitocondrial) responsable de más del 90% de la reducción del oxígeno en el organismo humano⁶.

En segundo lugar está la enzima superóxido dismutasa mitocondrial (SODm), que es miembro de una familia de metaloenzimas las cuales catalizan la dismutación del radical anión superóxido para formar oxígeno y peróxido de Hidrógeno. En las células de los organismos eucariotes existen tres tipos de SOD, además de la mitocondrial que contiene manganeso (Mn^{+2}) en su sitio

activo existe una citoplasmática con un átomo de Cu^{+2} y uno Zn^{+2} en su sitio activo (Cu, Zn-SOD) y la tercera es una SOD extracelular⁶.

Un tercer nivel de defensa esta constituido por un grupo de enzimas especializadas, tales como la catalasa que cataliza la conversión de H_2O_2 a H_2O y cuya actividad ha sido descrita en la mitocondria; o las peroxidasas que por diversos donadores de electrones reducen el H_2O_2 . En los mamíferos se ha descrito otra enzima importante, la glutatión peroxidasa (GPx), que se localiza en el citosol y en la mitocondria y cataliza la reducción de H_2O_2 a H_2O utilizando glutatión reducido (GSH) como donador de electrones. Acoplada a esta reacción, la glutatión reductasa (GR) reduce al glutatión oxidado (GSSG) utilizando nicotinamidaadenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), impidiendo así que se agoten las reservas de GSH⁶.

En el cuarto nivel, las EROs pueden ser neutralizadas por compuestos con propiedades antioxidantes conocidos como atrapadores de radicales libres. Estos pueden ser hidrofóbicos, como las quinonas y el α -tocoferol o vitamina E, este último considerado un excelente antioxidante ya que por su hidrofobicidad se encuentra en las membranas, incluyendo las de mitocondria, donde es particularmente un eficaz protector evitando la lipoperoxidación; o hidrofílicos como el GSH que participa en la reacción descrita anteriormente, entre otros. En muchos estudios se ha demostrado que el nivel de antioxidantes es de vital importancia para prevenir, revertir o al menos, reducir los daños causados por el desarrollo de EO⁶.

Una vez producido el daño molecular, el quinto nivel de defensa lo constituye la reparación. La mayor parte de las moléculas del organismo sufren un recambio constante, por lo cual son periódicamente reemplazadas. En el caso del material genético, los radicales de oxígeno son capaces de producir

rupturas en la cadena del ADN y aún de inducir mutagénesis, pero existen mecanismos enzimáticos de reparación que permiten mantener intacta la información genética, aunque en la mitocondria estos mecanismos de protección y reparación del material genético son menos que en el núcleo, por lo cual el ADN mitocondrial es particularmente susceptible al daño por EROs⁶.

3.1.2 Especies Reactivas del Oxígeno (EROs)

La mayor parte del oxígeno celular es reducido a través de reacciones enzimáticas, pero un 2-5 % escapa a esta reducción bivalente y elige la monovalente, y de ello resulta la formación de radicales libres de oxígeno (RLO), que no son más que átomos o moléculas que poseen un número impar de electrones en su órbita más externa, y que también se generan cuando ocurre una adición a un doble enlace¹³. Son muy inestables y pueden reaccionar con otras moléculas, entregando o recibiendo un electrón. Últimamente prefiere llamársele EROs, para agrupar a algunos compuestos que como el peróxido de hidrógeno, no constituyen un verdadero radical¹³.

Estas EROs son moléculas altamente reactivas que atacan constantemente al cuerpo humano mediante reacciones bioquímicas de REDOX, que ocurren como parte normal del metabolismo celular o por la exposición a factores ambientales y se forman de la manera siguiente: La reducción univalente del O_2 produce el radical superóxido (O_2^-) cuya fuente más importante es la NADPH oxidasa durante el estallido respiratorio¹³.

La reacción univalente subsecuente, genera el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a través de la enzima superóxido dismutasa (SOD), que no es un RLO, pero tiene una alta capacidad oxidante por vía de la reacción de Fenton, y

forma el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) que es varios miles de veces más reactivo que el O_2^- y deriva fácilmente a la formación de nuevos radicales libres¹³.

Otras especies reactivas existentes son: el peroxil ($\text{ROO}\cdot$) y el alcoxil ($\text{RO}\cdot$), resultantes de la acción del $\cdot\text{OH}$, que constituyen la fase inicial de la peroxidación lipídica⁴. También existe el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), el óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), el anión peroxinitrito ($\text{OONO}\cdot$) y el ion hipoclorito ($\cdot\text{HOCl}$) formado a partir del H_2O_2 por la enzima mieloperoxidasa (MPO)⁷.

3.1.3 Formación de Radicales Libres y Especies Reactivas del Oxígeno

- Mayormente por reacciones bioquímicas de oxidación-reducción del metabolismo normal en las que intervienen el oxígeno (catabolismo del triptófano, formación del colágeno; reducción de los ribonucleótidos)¹⁰.
- Por fagocitosis, como parte de una reacción inflamatoria controlada¹⁰.
- Ocasionalmente, en respuesta a la exposición de radicales ionizantes, luz ultravioleta, contaminación ambiental, humo del cigarro, hiperoxia, ozono, ejercicio excesivo, dióxido de nitrógeno, metales pesados, hidrocarburos halogenados¹⁰.

3.1.4 Sustancias que Pueden Modificar los Niveles de Radicales Libres

- Aumentándolos: halotano, acetaminofeno, adriamicina, menadiona, ozono, cloranfenicol, nitrofurantoína, aminoglucósidos, digitálicos, tetraciclina.
- Disminuyéndolos: vitaminas A, E, C, B6, Selenio, captopril¹⁰.

3.1.5 Reacciones de Óxido-Reducción y la Aparición de las EROs

Las células de nuestro cuerpo están expuestas constantemente a las reacciones de óxido-reducción y un ejemplo es la transformación de los alimentos ingeridos en sustratos más simples, de los cuales es posible obtener energía. Durante el proceso de reproducción celular se consume oxígeno y se genera ATP, lo que origina productos tales como anhídrido carbónico y agua. Sin embargo, durante esta transformación normal, se producen ER y RL¹¹.

Se cree que este proceso evolutivo inicio con la aparición de los organismos fotosintéticos, a la vez que se incrementaron los niveles de oxígeno en el medio ambiente, lo que permitió a estos seres desarrollar los mecanismos necesarios para utilizar esta molécula como aceptor final de e⁻, esto le proporcionó a la célula tener sistemas de producción de energía altamente eficientes a través de la oxidación de la glucosa. Por medio de esta ruta metabólica se producen hasta 38 moléculas de ATP por la oxidación de una molécula de glucosa. Esta ventaja evolutiva trajo como consecuencia el incremento en la producción de RL y EROs, pero a la vez, surgieron sistemas de defensa antioxidantes intra y extra celulares, tanto enzimáticos (las enzimas antioxidantes de mayor importancia son la CAT, la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPx) no enzimáticos (elementos principalmente exógenos, vitamina E, C, betacarotenos, polifenoles, flavonoides, oligoelementos, glutatión [GSH], urato, ubiquinol y proteínas plasmáticas) para mantener el equilibrio rédox en las células. Este equilibrio de Óxido-reducción es esencial para preparar la fisiología de los seres vivos y en todos los procesos metabólicos se producen pequeñas cantidades de RL¹¹.

3.1.6 Daño Oxidativo a los Principales Componentes de la Célula

Los RL al colisionar con una macromolécula, la oxidan al sustraerle un e^- y provoca que pierda su función específica en la célula. Dicho daño puede causar oxidación de lípidos, proteínas, hidratos de carbono, y efectos genotóxicos por la oxidación de nucleótidos, lo que produce acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial excitotoxicidad y apoptosis¹¹.

Los lípidos, son los más susceptibles al daño por los RL, específicamente los poli-insaturados que son fácilmente oxidables. El proceso de oxidación de los lípidos es peroxidación lipídica y los productos de estas reacciones se denominan lipoperoxidos (LPO). Por otra parte el daño que causan los RL a las proteínas es un proceso irreversible, el cual puede incrementar el enrollamiento erróneo de las estructuras secundarias o la pérdida de la formación de las estructuras terciaria y cuaternaria. Esto se debe a que todos los residuos de aminoácidos están sujetos al ataque por OH^- sin embargo, los aminoácidos que se oxidan con mas frecuencia son la fenilalanina, tirosina, triptófano, histidina y metionina y tal oxidación forma las proteínas carboniladas, que favorece el entrecruzamiento entre proteínas o con otras biomoléculas como la glucosa (glucosilación)¹¹.

La oxidación de ADN dependiente de EROs ocurre de forma parecida a la oxidación de proteínas y es sitio-específica. Involucra una reacción entre ADN, metales de transición y H_2O_2 . El ADN mitocondrial es más susceptible al daño oxidativo. Esta oxidación al ADN produce bases modificadas, lo que tiene serias consecuencias en el desarrollo de mutaciones y carcinogénesis por una parte, o la pérdida de expresión por el daño al gen específico, que puede provocar entrecruzamiento de proteínas-ADN, intercambio de cromátides

hermanas, alteración a la estructura de la desoxirribosa-fosfato y oxidación de las cuatro bases nitrogenadas¹¹.

Como ya se describió, el daño ocasionado por el EOX a la célula puede ocurrir por muchas rutas, pero independientemente de cual sea la vía, es evidente que el exceso de RL y ER provocan desequilibrio en la homeostasis de la célula. Tal alteración puede llevar al desarrollo de patologías crónico-degenerativas como es el caso de la DM, en donde el constante desequilibrio de la glucosa sanguínea (principalmente en pacientes mal controlados), produce en el organismo un estado de oxidación, lo que a su vez explica el por qué los diabéticos desarrollan complicaciones prematuras de diversa índole¹¹.

3.1.7 Sistema de Defensa Contra las EROs

Todos los seres vivos que utilizan el oxígeno para obtener energía, liberan EROs. Esta situación es incompatible con la vida, a menos que existan en las células mecanismos de defensa que las neutralicen¹³. A estas defensas se les denomina antioxidantes y se considera como tal a cualquier sustancia que en concentraciones normales posea una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interaccionar con un radical libre¹³. El antioxidante, al colisionar con un RLO le cede un electrón, que se oxida a su vez y se transforma en un RLO débil no tóxico (la vitamina E)¹³. No todos actúan de esta forma, en el caso de las enzimas catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan substratos que a su vez reaccionan con los RLO¹³.

Existe una primera línea de defensa antioxidante constituida por enzimas o eliminadores de radicales.

Enzimas:

– La citocromo oxidasa está encargada de evitar la reducción univalente del oxígeno.

– La superóxido dismutasa está especializada en captar el radical anión superóxido mediante una dismutación y así convertirlo en peróxido de hidrógeno.

– Catalasa y peroxidasas, glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR). Que neutralizan al H_2O_2 y lo convierten en agua.

– La vitamina E o α -tocoferol neutraliza al radical $OH\cdot$ por su ubicación en las membranas donde su protección es particularmente importante.

– La vitamina C, por su carácter reductor, reacciona rápidamente en el O_2 y con el $OH\cdot$; también es captor del oxígeno singlete y del ion hipoclorito¹³.

– El glutatión (GSH), además de captar el H_2O_2 como substrato de la GPx, también capta al 1O_2 y al $OH\cdot$.

– La transferrina y la ceruloplasmina son transportadoras de metales de transición, hierro y cobre respectivamente, que son generadores de RLO.

Este sistema defensivo, que lo mismo puede estar en el citosol que en las membranas, no es totalmente efectivo, por lo que hay involucrada una segunda línea constituida por:

– Sistemas reparadores de biomoléculas que reconstruyen el daño producido al ADN y que pudieran propiciar trastornos genéticos o cancerígenos.

– Sistemas eliminadores de componentes celulares oxidados como las macroxiproteinasas y las endonucleasas¹³.

A manera muy general los antioxidantes pueden actuar de las siguientes formas:

- Al disminuir la concentración de oxidantes.
- Al evitar la iniciación de la reacción en cadena al barrer (cubrir o detener una reactividad química elevada) a los primeros RL que se forman.
- Al unirse a iones metálicos para evitar la formación de EROs.
- Al transformar los peróxidos en productos menos reactivos.
- Al detener la propagación y el aumento de RL.

Por último, no se debe olvidar que los sistemas antioxidantes trabajan en forma coordinada en una serie de pasos metabólicos, por ejemplo en los sistemas enzimáticos el O_2^- al ser metabolizado por la SOD produce H_2O_2 , este a su vez se metaboliza hasta agua y oxígeno por la CAT o la GPx, que actúan en forma acoplada con la glutatión reductasa. Lamentablemente, se ha demostrado que estos sistemas antioxidantes disminuyen con la edad, en ciertos procesos patológicos y bajo condiciones ambientales como la contaminación atmosférica. Los seres humanos están literalmente bajo ataque, proveniente del medio ambiente contaminado, estilos de vida estresantes y una sociedad sobremedicada. Estas condiciones privan a los seres humanos de su condición más preciada, “la salud”. Y a pesar de que el organismo cuenta con sus propios sistemas de defensa, los cuales son capaces de neutralizar los RL, hoy en día estos no son suficientes para contrarrestar el daño, por eso es que se necesitan de “aliados” adicionales y estos pueden ser los antioxidantes. La

mayoría de estos, provienen de los vegetales y las frutas. Sin embargo, se debe tener presente de que en la actualidad, esto crea una brecha protectora, ya que los alimentos que se consumen, lamentablemente, contienen bajo contenido de antioxidantes y minerales, como resultado del agotamiento de minerales en el suelo, de la cosecha acelerada de los productos sin madurar, almacenamiento refrigerado, comidas altamente procesadas y a que la preparación de la comida es deficiente. Por lo tanto, durante el tiempo en que el organismo se encuentra expuesto a las condiciones desfavorables del medio ambiente que rodea a los seres vivos, sus sistemas de defensa naturales están abrumados y agotados. Por ello, es recomendable que se haga todo lo que esté al alcance para reconstruir los sistemas de defensa, al aprender como la alimentación completa y balanceada con dosis adecuada de antioxidantes y suplementos de alta calidad podría ser la mejor esperanza para contrarrestar el efecto tóxico y genotóxico que los RL producen al organismo, ya que de no prestar la debida atención a este problema y exponer de forma prolongada a las células al daño que provoca el EOX, es por demás seguro que el individuo desarrollará una enfermedad crónico-degenerativa¹³.

3.2 Estrés Oxidativo

En 1985, H. Sies propuso el concepto de estrés Oxidativo como un desbalance, en el que hay un aumento de oxidantes o una disminución de antioxidantes, en comparación con la situación definida como normal. El concepto está inspirado en la idea de estrés de H. Selye instalada para el síndrome general de adaptación fisiológica, y en la idea de Gerschman de que tanto la hiperoxia como la disminución de antioxidantes llevan a daño tisular³. El éxito del concepto fue inmediato y promovió la investigación biológica y clínica

al incluir el término de disminución de antioxidantes y abrir la estrategia intervencionista de suplementación con compuestos y vitaminas antioxidantes³. El concepto de estrés oxidativo fue aplicado experimentalmente a células, tejidos, y organismos enteros. En el ultimo caso mencionada considerando un estrés oxidativo sistémico y determinando los niveles de oxidantes y antioxidantes en sangre y plasma³. La relación causa efecto entre estrés oxidativo y situación clínica o enfermedad no esta resuelta y las dos posibilidades causales están en consideración. Una de las opciones, sostenida por M. Bergel, considera que el EOx es un desbalance que permite el establecimiento de la enfermedad, y utiliza como argumento que dietas pro-oxidantes (con alto contenido de lípidos auto-oxidables y bajo contenido de vitamina E). Cabe señalar que, cualquiera sea el mecanismo patogénico, la suplementación con antioxidantes en pacientes lleva a mejorar el EOx, la disfuncionalidad metabólica y la condición clínica³.

El proceso continuo de perdida gradual de las funciones fisiológicas desde el inicio de la edad adulta se ha asociado al proceso continuo de produccion mitocondrial de RL y al desarrollo de una condición de Eox³.

El estrés oxidativo es un estado que se caracteriza por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y la capacidad antioxidante de las células. En el paso a la vida oxigenada las células se dotaron de sistemas antioxidantes que pueden ser enzimáticos y por lo tanto involucran mecanismos algunas veces complejos, y no enzimáticos en los que participan biomoléculas que generalmente poseen menor peso molecular que las enzimas¹. El daño celular que producen las Especies Reactivas y los Radicales Libres, ocurre en los enlaces de proteínas, los fosfolípidos poliinsaturados de las membranas celulares, hidratos de carbono y ácidos nucleicos, lo que provoca gran variedad de cambios bioquímicos y fisiológicos

en la célula, ocasionados por la activación de una reacción en cadena. Esto induce a que se presenten diversas enfermedades, como diabetes, aterosclerosis, procesos inflamatorios, el de isquemia/reperfusión, enfermedad de Alzheimer, Parkinson, cataratas, depresión, diversos tipos de cáncer, entre otros¹¹. La producción de especies reactivas del oxígeno está dada constantemente en la mitocondria¹⁸.

Las sustancias que participan en las reacciones de los sistemas de defensa antioxidante se inactivan o deterioran en determinadas situaciones. Este deterioro puede ser causado por alguna enfermedad crónica o transitoria que provoca incrementos sustanciales en la producción de oxidantes y prooxidantes¹. La implicación del estrés oxidativo en diversas patologías ha sido estudiada por numerosos investigadores¹⁸. Entre estas patologías se encuentra la diabetes mellitus y el embarazo; aunque este último no es un estado patológico sino de adaptación metabólica¹⁸.

3.3 Diabetes Mellitus

La hiperglicemia constituye la principal manifestación de la diabetes mellitus y está implicada en la aparición de las complicaciones que se presentan asociadas con la enfermedad. Estas consisten en un heterogéneo grupo de disfunciones clínicas que afectan el sistema nervioso, el sistema vascular, el riñón, la retina, el nervio periférico, el lente y la piel¹⁹.

Los diabéticos exhiben alta actividad de RL, originando intermediarios químicos altamente reactivos y tóxicos¹². Los individuos diabéticos tienen 25 veces mayor probabilidad de contraer ceguera, 20 veces más riesgo de amputaciones y de 6 a 10 veces más riesgo de padecer de enfermedades

coronarias.² Esta situación de desequilibrio comienza en una etapa temprana de la enfermedad, como se ha demostrado en varios estudios. La susceptibilidad de los diferentes tejidos a la exposición de radicales libres en diabetes espontánea y experimental es muy variada y se modifica además en el desarrollo de la enfermedad¹⁹.

Recientemente, se ha postulado que la hiperglicemia sostenida favorece la autooxidación de la glucosa por disminución del óxido nítrico (uno de los principales agentes vasodilatadores y antiagregante en el organismo), lo cual causaría desbalance en los mecanismos de oxidación y antioxidación que conllevaría a hiperproducción de radicales libres de oxígeno (RLO), ocasionando disturbios en la mecánica metabólica de muchos tejidos, células endoteliales membranales, apoptosis de las células β de los islotes de Langerhans que originan la insulina, oxidación de las lipoproteínas de baja densidad e inactividad de vitaminas antioxidantes, lo que favorece la generación de RL y conlleva a fenómenos aterogénicos, hipertensión y microangiopatía diabética. Las especies reactivas de oxígeno oxidan lípidos (peroxidación de lípidos), proteínas que causan lesiones en las membranas, inactivación enzimática y cortes en la doble cadena del DNA¹².

En el estudio de las causas implicadas en la aparición de esta patología se ha demostrado que altos valores de glicemia conducen a un estrés oxidativo. Esto se debe a que la glucosa se autooxida y da lugar a la formación de alfacetoaldehídos, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical superóxido (O_2^-), entre otras especies reactivas del oxígeno (ERO). También se plantea que el descontrol de la glicemia conduce al incremento de la velocidad de los procesos de glicosilación y oxidación de lípidos y proteínas de membrana, lo que provoca cambios conformacionales de estas macromoléculas y por lo tanto el deterioro de sus funciones¹⁹.

Los productos que se forman se conocen como AGE (*advanced glycosilation end products* [productos finales de la glicosilación avanzada]). Un número de estas sustancias que se forman de modo irreversible son capaces de hacer enlaces covalentes con otras proteínas para potenciar así el daño. En el caso de las complicaciones vasculares se conoce que su fisiopatología está caracterizada por una anormal unión de proteínas de la circulación y una progresiva constricción del área luminal en grandes y pequeños vasos¹⁹.

En los pacientes que padecen de diabetes mellitus se producen cambios en indicadores bioquímicos que evidencian una situación de estrés oxidativo: disminuyen las concentraciones plasmáticas de vitaminas antioxidantes como la A y E, se incrementa la concentración sanguínea de sustancias reactivas la susceptibilidad de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) a la oxidación, menor capacidad antioxidante total del plasma y se daña el material genético¹⁹.

3.3.1 Impacto Social de la Diabetes Mellitus

Las causas más frecuentes de muerte en la DM son por complicaciones cardiovasculares prematuras, cerebrovasculares y falla renal. Esto se debe principalmente a la poca o nula conciencia que existe por parte de los pacientes de disciplinarse en sus hábitos alimentarios, así como el de medicarse bajo vigilancia médica con el fin de mantener un control adecuado de glucosa sanguínea. Debido a estos factores, los diabéticos mal controlados se condicionan a padecer sufrimiento, dado a las múltiples complicaciones que se presentan de forma prematura por la hiperglucemia, lo que origina disminución drástica de su calidad de vida. Además de que tanto para las instituciones empresariales como de salud, implica grandes pérdidas económicas debido a las constantes solicitudes de incapacidad que se expiden para estos pacientes.

De ahí la importancia de buscar con urgencia nuevas estrategias terapéuticas que puedan ayudar a contrarrestar los efectos crónico-degenerativos ocasionados por esta enfermedad¹¹.

3.3.2 Aspectos Históricos de la DM

La DM no es un “mal de este siglo”, sino que se conoce desde la antigüedad. La observación inicial de que este síndrome no es una sola enfermedad se acredita a dos médicos hindúes, Chakrata y Susruta 600 a. C.), quienes distinguieron dos variedades de esta patología, aunque si bien, la mayoría de las descripciones bibliográficas de este tiempo hacen referencia a la DM tipo I. durante los siglos XVIII y XIX se describió otra variedad de este trastorno que comprende menos síntomas clínicos y que hoy se conoce como DM tipo 2. A mediados de 1930, Himsworth postuló que existían por lo menos dos variedades clínicas de DM: sensible e insensible a insulina. Sus observaciones clínicas se confirmaron cuando Bornstein y Lawrence diseñaron un bioanálisis para insulina. En 1940, dichas observaciones fueron contundentes al aparecer el radioinmunoanálisis¹¹.

3.3.2.1 Participación de la Mitocondria en la Enfermedad

La mitocondria es parte importante de la vida y la muerte celular. Es esencial para mantener la entropía necesaria para sustentar la vida. Es la mitocondria quien provee la energía necesaria para casi todos los procesos celulares que finalmente permiten llevar a cabo funciones tales como contracción muscular, mantener los gradientes iónicos, para poder llevar a cabo acumulación y secreción de hormonas y neurotransmisores, además de que

participa de manera importante en la muerte celular por el mecanismo de apoptosis. Por estas razones resulta evidente que alteraciones en la función mitocondrial pueden llevar a enfermedades, provocando desde alteraciones en su metabolismo hasta la muerte celular⁶.

Los procesos de enfermedad en los cuales la disfunción mitocondrial ha sido identificada y tiene un importante papel, generan una lista que crece rápidamente. El daño mitocondrial en células β -pancreáticas causa diabetes, las mitocondrias sufren daño durante la isquemia y aún más durante la reperfusión de un tejido. Además, la disfunción mitocondrial ha sido implicada en la mayor parte de las enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer, enfermedad motoneuronal, y la acumulación de defectos mitocondriales es señalada como un mecanismo de envejecimiento y enfermedades relacionadas con la edad⁶.

3.4 Evidencias de Diabetes y Estrés Oxidativo

Se ha descrito que la DM está asociada con las reacciones oxidativas catalizadas por la transición de metales descompartamentalizados. Esta serie de hallazgos concuerdan con estudios que presentan considerables evidencias en las que se sugiere que el EOx juega un importante papel en la patogénesis y complicaciones de la DM. Los mecanismos que pueden contribuir al aumento de dicho estrés en pacientes diabéticos son diferentes, en particular en aquellos sujetos con pobre control de la glicemia e hipertriglicemia. Estos mecanismos que participan en la formación de RL en diabéticos no solamente incluyen el incremento de la glucosilación no enzimática y la auto-oxidativa, sino que también el estrés metabólico, que es el resultado de cambios en la energía del metabolismo, en el nivel de los mediadores de la inflamación y en el caso del

sistema antioxidante de defensa. En estudios realizados por Sardas y cols. (2001), en pacientes diabéticos apoyan esta teoría. Ellos encontraron incremento de ROS, tales como O_2^- , H_2O_2 , OH^- lo que contribuyó a que se dañara el ADN de linfocitos en sangre periférica. Dicho daño oxidativo afecta tanto al ADN nuclear como al mitocondrial. Al respecto, Ames y cols. (1993), estimaron que una célula humana recibe 10,000 impactos oxidativos en el ADN/día producidos por OH^- es decir, de cada 10^{12} moléculas de oxígeno que entran a la célula/día, es posible que 1 en 200 dañen al ADN¹¹.

Los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (diabetes mellitus no insulino dependientes, DMNID), que exhiben control deficiente de la glicemia tienen una actividad antioxidante total disminuida, esto induce a defectos en la protección contra los RLO y a susceptibilidad al daño oxidativo (Maxwell *et al.*, 1997). Por tanto, se considera de importancia la medición del estado antioxidante total en sujetos con diabetes mellitus tipo 2, ya que es un reflejo de los niveles de RL con el objeto de permitir instaurar medidas terapéuticas que conlleven a mejor calidad de vida de los individuos con esta entidad¹².

3.4.1 Como el Estrés Oxidativo Causa Daño a los Diabéticos

Las evidencias acumuladas indican que el incremento en la producción de RL como el ión superóxido o reducción del estatus antioxidante, juegan un importante papel para que se presente el EOx. Estos mecanismos incluyen a su vez la glucoxidación y la formación de productos avanzados de glucosilación, activación de la vía de los polioles, inactivación de las enzimas antioxidantes, del metabolismo del ascorbato y descontrol en el metabolismo del óxido nítrico (NO) y de las prostaglandinas. El estado de hiperglucemia produce en la

mitocondria RL, los cuales se pueden disminuir por la acción de la CAT, la SOD, el ácido lipoico y la L-propionil carnitina¹¹.

Es evidente, que la alteración en algunos procesos bioquímicos celulares, como sucede con el metabolismo de la glucosa, específicamente en la hiperglucemia, la cual causa EOX en la célula, son provocados principalmente por factores como la sobrenutrición y la disminución de la actividad física en el individuo, lo que a su vez desencadena:

- Sobrecarga celular de ácidos grasos libres.
- Disfunción endotelial.
- Resistencia a la insulina, en el músculo.
- Alteración de la secreción de insulina en las células beta¹¹.

3.5 Neuropatía Diabética

La neuropatía diabética es un trastorno neurológico funcional o estructural selectivo de fibras o troncos nerviosos múltiples, cuyas causas pueden ser variadas. Es el motivo más frecuente del dolor neuropático, incluso los pacientes acuden a consulta con esta molestia sin conocer su problema de diabetes. Se considera que 50 por ciento de las personas diabéticas la presentan en cualquiera de sus modalidades, de donde la polineuropatía periférica con diabetes recién diagnosticada representa el 8 por ciento, cifra que

se eleva al 42 por ciento para los pacientes con diabetes de 10 o más años de evolución⁹.

3.5.1 Importancia de los Radicales Libres en Algunas Patologías

Los radicales libres son los últimos patógenos que han surgido en el panorama médico, aunque ha sido posible demostrarla generación de radicales libres en prácticamente todos los órganos⁵.

3.5.1.1 Patologías del sistema nervioso

El cerebro tiene ciertos atributos que lo hacen especialmente vulnerable al ataque de los radicales libres. Es un órgano altamente oxigenado, responsable del consumo de casi una quinta parte del oxígeno total consumido por el organismo. Debido a las dificultades técnicas para la determinación de radicales libres en tejido cerebral, todavía no se conoce el papel que dichos radicales juegan en la patología de la isquemia cerebral⁵.

Una de las primeras enfermedades del cerebro que se pensó que podían estar asociadas con la producción de radicales libres es la enfermedad de Párkinson. Las neuronas dopaminérgicas principalmente afectadas en la enfermedad de párkinson son las neuronas mecanizadas de la parte compacta de la sustancia nigra. Aunque la causa de la muerte de las células nigra es aún desconocida, se ha implicado a los radicales libres de oxígeno como un mecanismo citotóxico potencial⁵.

Puesto que no se conoce ningún mecanismo de defensa frente a estos radicales se produciría daño oxidativo en el cerebro de pacientes con la enfermedad de Parkinson⁵.

3.5.1.2 Procesos tumorales

En un proceso de carcinogénesis se pueden distinguir dos fases. La primera, o de iniciación, pueden considerarse como la generación o activación de un oncogen. Este paso puede darse por la integración de un retrovirus, por una mutación, o bien por una transposición inducida por daño en el DNA. Si embargo, esta fase, aunque necesaria, no es suficiente para que se produzca la transformación de la célula, a no ser que la célula se encuentre en un estado de crecimiento. Este estado de crecimiento puede ser activado de varias maneras, y a los agentes que producen esta activación, se les conoce con el nombre de promotores. Así, para que tenga lugar un proceso canceroso, se requieren dos elementos: a) activación del oncogen, y b) activación de un estado proliferativo⁵.

Los radicales libres pueden estar implicados en procesos de iniciación y promoción de los procesos tumorales, ya que atacan al DNA, produciendo roturas de cadenas sencillas y dobles, uniones cruzadas entre cadenas de DNA, aberraciones cromosómicas, iniciando así un proceso de carcinogénesis. Por otra parte, la evidencia indirecta de que los sistemas antioxidantes protegen a las células de la promoción de los procesos tumorales indica que los radicales libres están implicados en este proceso⁵.

3.5.1.3 Diabetes

La diabetes mellitus es una enfermedad heterogénea, caracterizada por una deficiencia, absoluta o relativa, de insulina y resistencia a la insulina⁵.

El páncreas es órgano relativamente bajo en enzimas antioxidantes, por lo que es más sensible al ataque oxidativo. De hecho, se ha sugerido que parte de la lesión que tiene lugar en las células β del páncreas es debida al ataque

por diferentes radicales libres como lipoperoxidos y peróxido de hidrógeno. La acción combinada de los radicales libres y la hiperglucemia puede tener efectos importantes sobre el nivel de expresión de SOD en los eritrocitos de pacientes con diabetes⁵.

3.5.1.4 Cataratas

Las cataratas son la patología más frecuente del cristalino y es una de las causas más importantes de ceguera reversible. Se ha propuesto que varias especies activadas de oxígeno como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo, pueden estar implicados en la cataractogenesis. Sin embargo no se conoce con detalle como estas especies activadas de oxígeno y sus reacciones pueden iniciar la formación de cataratas. Se ha observado una mayor concentración de peróxidos de hidrógeno en ojos con cataratas. Además, se ha observado que los radicales libres de oxígeno se generan en cantidad excesiva en varias cataratas experimentales y en cataratas seniles humanas, como consecuencia de la fotooxidación del cristalino, de una mayor peroxidación lipídica y de un descenso en las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas de los cristalinos con cataratas⁵.

3.5.1.5 Síndrome de Down

Patología en la que la SOD, se encuentra alterada. El gen que codifica la SOD, ha sido localizado en el cromosoma 21, concretamente en la región 21q22. Se ha determinado en muchos casos de trisomía 21 la actividad de SOD, observándose un efecto de dosis, es decir, los pacientes afectados de trisomía 21 mostraban un 50% más de actividad de SOD⁵.

Se ha detectado, también, en los linfocitos de pacientes afectados por el síndrome de Down, una mayor protección frente a las radiaciones y mayor estabilidad de las cadenas de DNA, frente al ataque del radical $\cdot\text{OH}$ ⁵.

3.5.2 Síndromes, Enfermedades y Procesos Degenerativos que se Consideran Relacionados con el Estrés Oxidativo

- Sistema nervioso central: esquizofrenia, enfermedades de Parkinson y Alzheimer, esclerosis múltiple, distrofia muscular de Duchenne, ataxia-telangiectasia¹⁰.
- Ojos: cataratas, degeneración macular, retinopatías del diabético y del prematuro¹⁰.
- Sistema respiratorio: asma, cáncer pulmonar, síndrome de dificultad respiratoria del adulto¹⁰.
- Sistema cardiovascular: aterosclerosis, infarto del miocardio, hipertensión, miocardiopatía¹⁰.
- Sistema digestivo: hepatitis, cirrosis hepática, diabetes, pancreatitis, cáncer del colon, colitis¹⁰.
- Sistema genito-urinario: insuficiencia renal, infertilidad masculina¹⁰.
- Sistema osteomioarticular: artritis reumatoidea, artritis psoriática, síndrome del hombre rígido¹⁰.
- Piel: eczema, melanoma, dermatitis de contacto¹⁰.
- Otros: mutagénesis, caquexia, Síndrome de Werner, envejecimiento¹⁰.

3.6 La Defensa Antioxidante y Su Relación Con Diferentes enfermedades

El sistema antioxidante protege a los tejidos de los efectos de los radicales libres. Los antioxidantes se clasifican en primarios, secundarios, y terciarios, en dependencia de su función²⁰.

En el primer grupo, los enzimáticos, se encuentran fermentos que protegen al organismo contra la formación de nuevos radicales libres, entre los que se encuentran:

- Superóxido dismutasa (SOD) que transforma el oxígeno en peróxido de hidrógeno²⁰.
- Glutación peroxidasa (GPX) que convierte el peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos en moléculas inofensivas antes de que puedan formar radicales libres²⁰.
- Proteínas de unión a metales (GR) que frenan la disponibilidad del Fe, necesario para la formación del radical $\cdot\text{OH}$ ²⁰.

En el segundo grupo de antioxidantes, los secundarios no enzimáticos hay 2 subgrupos:

- Antioxidantes hidrofílicos: entre los que se encuentran la vitamina C, (ascorbato), ácido úrico, bilirrubina y albúmina²⁰.
- Antioxidantes lipofílicos: entre los que se encuentran la vitamina E (alfatocoferol), carotenoides y las ubiquinonas²⁰.

Dentro de los antioxidantes terciarios, encargados de reparar biomoléculas dañadas por los radicales libres se incluyen las proteasas reparadoras de ADN y la metionina sulfóxido reductasa²⁰.

La defensa antioxidante, enzimática y no enzimática protege al organismo contra el daño oxidativo, pero no con el 100% de eficiencia²⁰.

Las causas de deficiencias del sistema antioxidante son ingestión baja de antioxidantes dietarios¹⁰. Enfermedades que reducen la absorción de nutrientes antioxidantes (enfermedad de Crohn)¹⁰. Nutrición parenteral normal¹⁰. Diálisis renal¹⁰.

3.7 La Suplementación de la Dieta Con Antioxidantes

La suplementación con vitaminas antioxidantes como a vitamina C y E constituye un tema de actualidad. Se ha comprobado una disminución de los niveles plasmáticos de ambas vitaminas, aun con ingestas elevadas de vegetales, para sujetos normales y a partir de los 50 años para las mujeres, y a los 55 años para los hombres. La dosis recomendable para humanos normales de edades superiores a las mencionadas, es de 500 mg vitamina C/día y de 400 mg vitamina E/día. Los mismos niveles están recomendados para mujeres embarazadas, con mejora en la posibilidad de pre-eclampsia, para pacientes recibiendo quimioterapia, para pacientes con hepatitis o SIDA, y para la etapa pre-quirúrgica en casos de revascularización cardiaca o de trasplante de órganos¹³.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Bioquímica Clínica del área de especialidad del Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Sonora, Unidad Regional Norte Caborca.

4.1 Material Biológico

El objeto de estudio fueron personas adultas con padecimiento de Diabetes Mellitus tipo II quienes forman parte del grupo de Ayuda Mutua, “LA ESPERANZA DEL MAÑANA”, pertenecientes al Centro de Salud Rural de H. Caborca, Sonora.

En este lugar efectuamos pláticas de introducción primeramente con el Director de dicha institución, logrado el permiso acudimos con la enfermera Francisca Ortega, encargada del grupo de Diabéticos, durante las pláticas nos presentamos tanto el director de la tesis y una servidora como tesista, quienes expusimos que pretendíamos desarrollar una tesis en la que se Determinaría el Estado Antioxidante Total en Pacientes con Diabetes Mellitus Tipo II y que nos gustaría aprovechar al grupo de Ayuda Mutua “La esperanza del mañana”, siendo ellos las personas objeto del estudio y que su aportación sería una muestra de sangre venosa

Las personas encargadas mostraron interés en el estudio, ya que este tipo de análisis no es de rutina ni se realiza en todos los laboratorios, por parte de las autoridades de la institución tuvimos el consentimiento para presentarnos en una sesión de su grupo, la cual se presenta cada día martes por la mañana,

donde las personas que ahí asisten radican en la Ciudad de H. Caborca, Sonora y en los ejido pertenecientes a este municipio.

En los días posteriores, hicimos entrega personalmente de un documento impreso al Director de la institución, donde se pide su apoyo para éste proyecto, solicitado por el M.C. Q.F.B. Ramón Efraín Lugo Sepúlveda, director de la tesis y el Q.B. Eligio Espinoza Ojeda Jefe del Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias y firmando por los mismos. Éste fue firmado de recibido.

La enfermera encargada del grupo nos hizo entrega de las listas con los datos de cada integrante del equipo, se me permitió el acceso a los archivos de cada uno de ellos en ésta institución para ver el historial de la enfermedad y como ha ido evolucionando, en una siguiente visita en noviembre se hizo entrega del protocolo del proyecto al director de la institución y se aprovecho para aplicar una encuesta a cada persona integrante del grupo, donde se indagó acerca de los antecedentes médicos personales y familiares, hábitos tales como: dieta, sedentarismo, horas de ejercicio, tabaquismo, alcoholismo, síntomas, edad, nombre, etc., (ver formato de encuesta en anexos).

4.2 Toma de Muestra:

Se realizó en dos sesiones debido a la cantidad de personas integrantes del grupo.

Para la punción sanguínea se ocupó el siguiente material: torniquete, guantes de nitrilo, equipo vacutainer para punción, tubos tapón rojo, ambos marca B.D., torundas con etanol al 70%, canastilla portadora de gradilla, recipiente para material punzocortante, bolsas con gel congelante.

La toma dio inicio el 08 de diciembre de 2009 a las 8:00 a.m.,previo ayuno de 12 horas, el primer grupo fue de 27 personas de ambos sexos, con edades de 41 a 77 años, siendo 3 hombres y 24 mujeres todos diagnosticados con Diabétes mellitus tipo 2. A cada uno de los integrantes del grupo se le toma glucosa y presión al llegar al grupo.

Al completar las 27 muestras, colocadas en la gradilla para tubos de ensayo, y etiquetadas de manera correspondiente, se depositaron en una hielera la cual contaba con bolsas de gel congeladas para ser transportadas a la Universidad de Sonora, se llevaron al laboratorio de análisis bioquímicos, donde se dejaron reposar en el refrigerador por 1 hora y separar el suero por centrifugación a 5000 r.p.m., por 10 minutos, en una centrifuga de la marca Thermo Scientific.

Una vez obtenidos los sueros, fueron separados en tubos de ensayo nuevos de 13 x 100 con ayuda de pipetas Pasteur, cada suero se rotuló con el número correspondiente a la muestra sanguínea, se colocaron en la gradilla y se mantuvieron en refrigeración a -8°C hasta su uso.

4.3 Determinación del Estado Antioxidante Total (TAS)

El kit TAS ANTIOXIDANTES (Totales) marca Randox de 5 x 10 mL y el control para TAS de la misma marca se mantuvieron en refrigeración hasta su uso. Todo este material fué patrocinado por la Universidad de Sonora.

Se procedió a la preparación de los reactivos contenidos en el kit TAS ANTIOXIDANTES (Totales) Método Randox ya que se utilizaría para las determinaciones, y se preparó el control de calidad ESTADO ANTIOXIDANTE TOTAL (TAS CONTROL), suero control.

Para la preparación de reactivos, ver anexos.

Se usó un espectrofotómetro marca Thermo Scientific Genesys 20, el cual 5 minutos antes se calibró frente a aire y a 600 nm.

Una vez hidratado el suero control se dejó reposar por media hora y se dio inicio con las determinaciones.

La capacidad antioxidante total fue medida utilizando la reacción cinética de formación del radical ABTS 2,2-azino-3-etilbenzotiazolin sulfonato, el cual se incubó con peroxidasa (metamioglobina) y H_2O_2 para dar el radical catión ABTS, el cual presenta una coloración verde-azulada relativamente estable.

La presencia de los antioxidantes en el suero suprimió la coloración verde-azulada del radical $ABTS^+$ proporcionalmente a la concentración de éstos.

La cinética de la reacción fue medida a 600 nm en el espectrofotómetro. Se utilizó como material de control de calidad el proporcionado por la misma casa comercial. El cuál se corrió antes de iniciar con las mediciones de las muestras, y cada 5 muestras problema para mejor calidad en los resultados.

Una vez que tenemos los sueros correspondientes a cada muestra problema listo y que el suero control ha reposado, iniciamos con las determinaciones con el espectrofotómetro ya calibrado.

4.4 Procedimiento Para el Análisis

Se tomó una cubeta de plástico de 1mL de espesor nueva y se pipetearon 20 μ L de agua bidestilada con una micropipeta de la marca Oxford y

1mL de cromógeno, se mezcló perfectamente y se colocó en el espectrofotómetro obteniendo la absorbancia inicial A_1 para el blanco, después se pipetearon 200 μ L de sustrato con una micropipeta de la marca Oxford, se mezcló colocándose en el espectrofotómetro exactamente por 3 minutos, obteniendo de esta manera la absorbancia 2, A_2

Para el patrón se efectuó el mismo procedimiento cambiando el agua bidestilada por el patrón.

De igual forma para cada uno de los sueros problema se procedió de manera semejante.

El suero control se midió al principio y cada 5 muestras problema para un mejor control de calidad.

Una vez obtenidas las lecturas de las absorbancias de cada una de las muestras problema del primer grupo, se calculó el Estado de los Antioxidantes Totales mediante la fórmula:

$$\text{Factor} = \text{concentración del patrón}/(\Delta A \text{ blanco} - \Delta A \text{ patrón})^{10}.$$

Ya obtenido el factor general, se calcula en mmol/L el resultado de cada muestra problema, con la fórmula:

$$\text{Mmol/L} = \text{factor} * (\Delta A \text{ blanco} - \Delta A \text{ muestra})^{10}.$$

Para cálculos y resultados, ver anexo número #9.4 procedimiento..

4.5 Grupo control

Para esta investigación se analizó un grupo control integrado por 11 personas clínicamente sanas de ambos sexos con edades de 20 a 33 años, a las cuales se les tomó una muestra de sangre por venopunción directa en tubos vacutainer de tapón rojo, para la obtención de suero de cada muestra control. El análisis se llevó a cabo de la misma manera que al grupo problema, mediante la técnica TAS ANTIOXIDANTES (Totales) Método Randox.

Esto con la finalidad de hacer un estudio comparativo de resultados de personas clínicamente sanas, con los resultados de las personas objeto de estudio.

En febrero de 2010, acudimos a la sesión del grupo de AYUDA MUTUA para continuar con la toma de muestras sanguíneas al segundo grupo, en ésta ocasión se tomaron 15 muestras por venopunción directa en tubo vacutainer de tapón rojo para obtener el suero correspondiente a cada muestra sanguínea, los pacientes fueron 15 repartidos de la siguiente manera: 5 hombres y 10 mujeres, con edades de 43 a 77 años.

El total de muestras analizadas fue de 42 pertenecientes al grupo de AYUDA MUTUA “La esperanza del mañana”, inscritos en el Centro de Salud Rural de H. Caborca, Sonora, personas adultas de ambos sexos que están diagnosticados con Diabetes Mellitus tipo II.

5.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las tablas A y B muestran el total de pacientes diagnosticados con diabetes mellitus tipo 2 y el grupo control. Los primeros están ordenados por sexo con un total de 39, el segundo por edad con un total de 11.

Número de muestra	Sexo	Edad (años)	Resultado en mmol/L
6B	H	36	2.103
12B	H	43	2.057
1B	H	47	2.102
26	H	48	2.036
1	H	48	2.08
22	H	52	2.058
3B	H	61	2.08
10B	H	67	2.148
29	M	41	2.036
12	M	44	1.538
13	M	44	2.015
25	M	45	1.56
15	M	46	2.058
3	M	47	1.97
19	M	49	2.015
8	M	50	1.906
7	M	50	2.01
23	M	51	1.993
9	M	52	2.08
30	M	53	2.036
6	M	53	2.08
4B	M	53	2.103
13B	M	53	2.192
16	M	56	1.993
14	M	57	2.08
2B	M	57	2.08

10	M	58	1.993
21	M	58	2.058
11B	M	58	2.17
18	M	59	2.08
5B	M	59	2.125
7B	M	60	1.989
11	M	64	1.278
28	M	64	2.015
4	M	64	2.05
9B	M	64	2.103
20	M	67	1.993
24	M	77	2.058
8B	M	77	2.125

Tabla A. Se muestra el total de pacientes por sexo y edad, y su resultado de AOT. (se eliminaron 4 muestras hemolizadas)

Número de muestra	Sexo	Edad (años)	Resultado en mmol/L
3	M	20	2.169
1	M	21	2.012
6	M	21	2.169
10	M	21	2.192
2	M	22	2.125
4	H	23	2.169
5	H	24	2.102
8	M	23	2.192
9	M	24	2.147
7	M	30	2.147
11	H	33	1.99

Tabla B. Se muestra el total del grupo control agrupado por edad y resultados

5.1 Análisis de resultados

De acuerdo a los datos proporcionados del estudio del efecto de la Edad sobre el Análisis de Antioxidantes Totales en muestras de sangre de 39 pacientes diagnosticados con Diabetes Mellitus. Se hicieron los siguientes análisis estadísticos:

5.2 Características de la muestra

Se analizaron los resultados del análisis de sangre de 8 hombres y 31 mujeres de edades de 36 a 77 años de edad. Entre los pacientes la edad se distribuyó en forma normal como se muestra en la Figura 1, con una edad promedio de 55 años y desviación típica de 9 años. De acuerdo al diagrama de Tuckey se observa que el 50% de la muestra tenía de 48 a 60 años de edad. Estos pacientes fueron elegidos para el presente estudio debido a que pertenecen al grupo de ayuda mutua del centro de salud Rural de H. Caborca, Sonora, y podríamos estar en contacto con ellos semana a semana, ya que son pacientes que decidieron buscar ayuda porque no lograban controlar sus niveles de glucosa y algunos de ellos además con otras complicaciones como hipertensión arterial y otros hasta neuropatía diabética, que quizá no sabían que la padecían, solo decían tener algunos dolores en su cuerpo y otras síntomas, todo esto debido a los malos cuidados de su Diabetes, como alimentación, falta de ejercicio, fumar, etc.

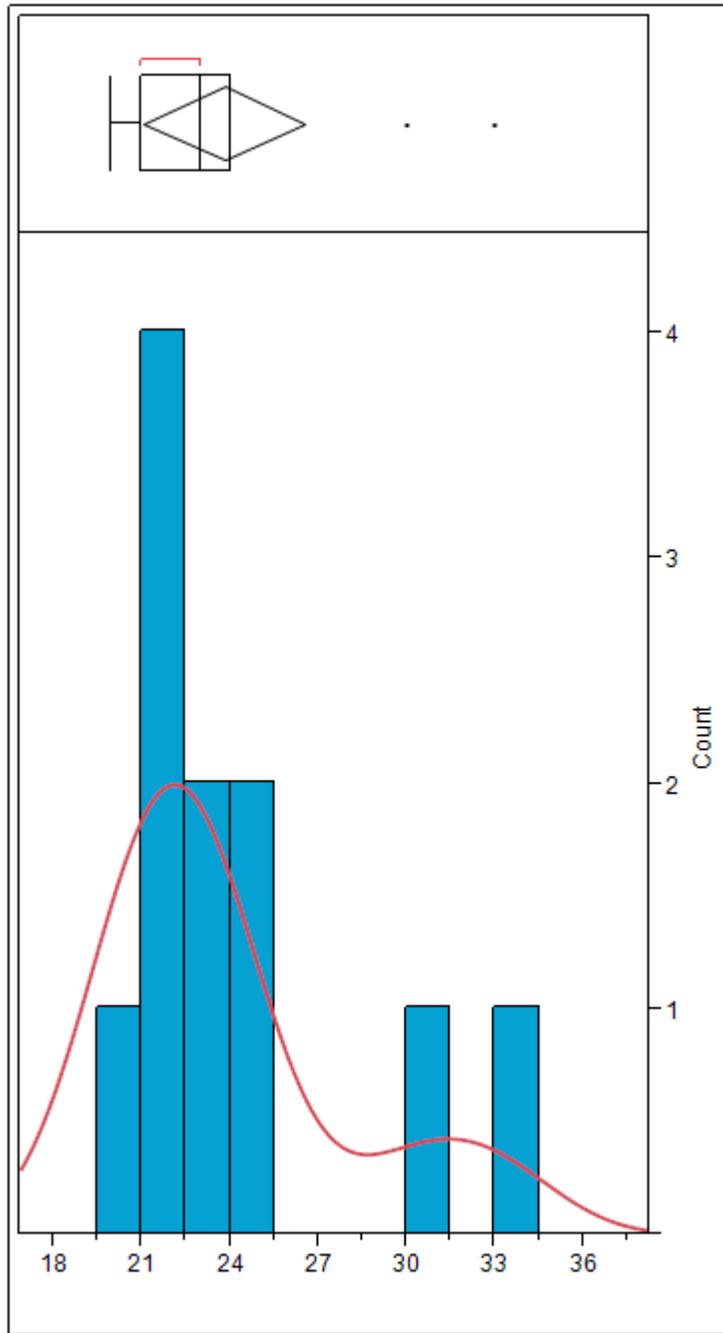


Figura 1. Diagrama de frecuencia de edades en la muestra de personas del grupo control.

Para el control (Figura 1) se escogieron 11 personas sanas entre los 23 a 30 años de edad, resultando un promedio de 23 ± 4 años de edad.

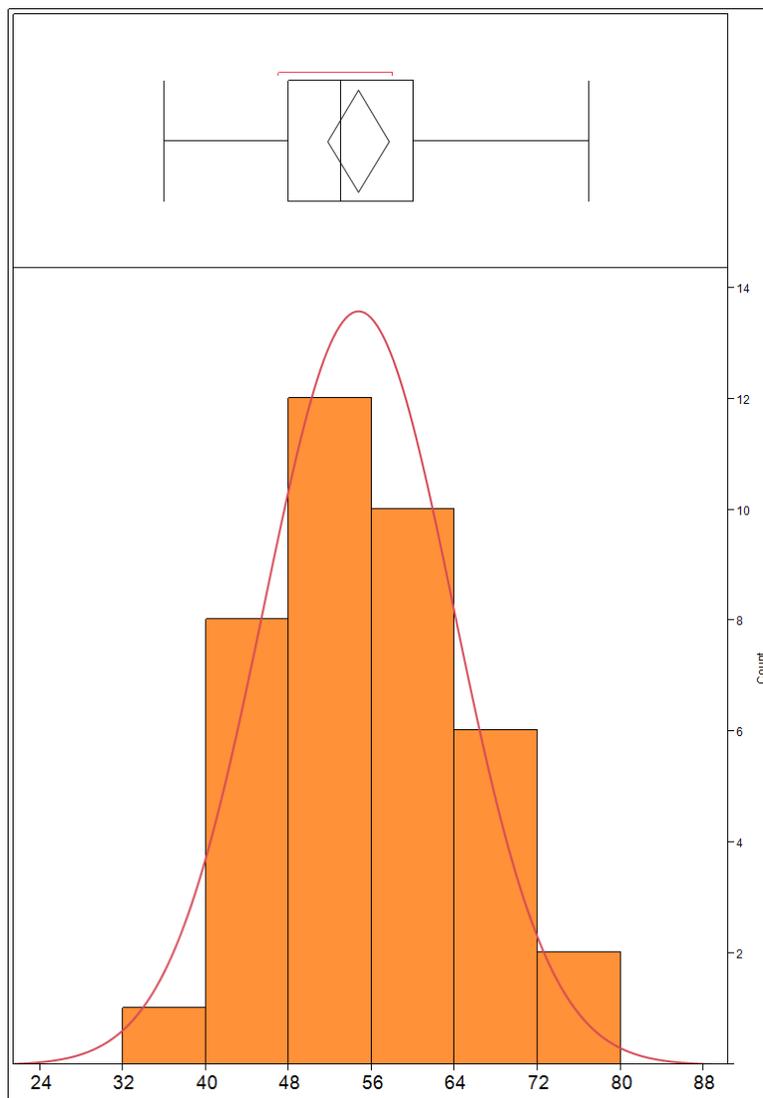


Figura 2. Diagrama de frecuencia de edades en las personas del grupo de estudio.

5.3 Análisis de antioxidantes totales (AOT)

Los resultados de los análisis al total de pacientes mostraron valores que van desde 1.2 hasta 2.2 mmol/L de antioxidantes, con un valor promedio 2.0 mmol/L como se muestra en la Figura 3. Sin embargo puede observarse que tres valores presentaron discrepancia de la mayoría de los datos por lo que puede considerarse que los valores de AOT en el control oscilan entre 1.9 a 2.2 mmol/L.

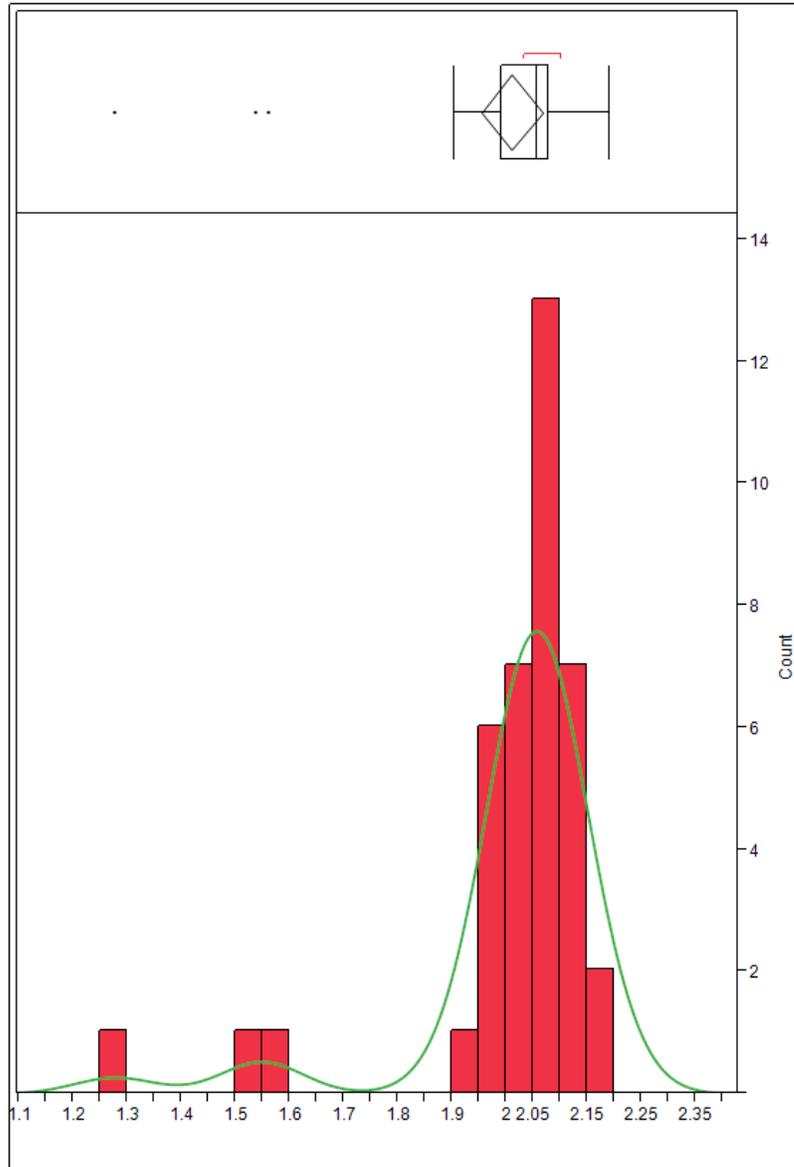


Figura 3. Resultados del análisis de antioxidantes totales en pacientes.

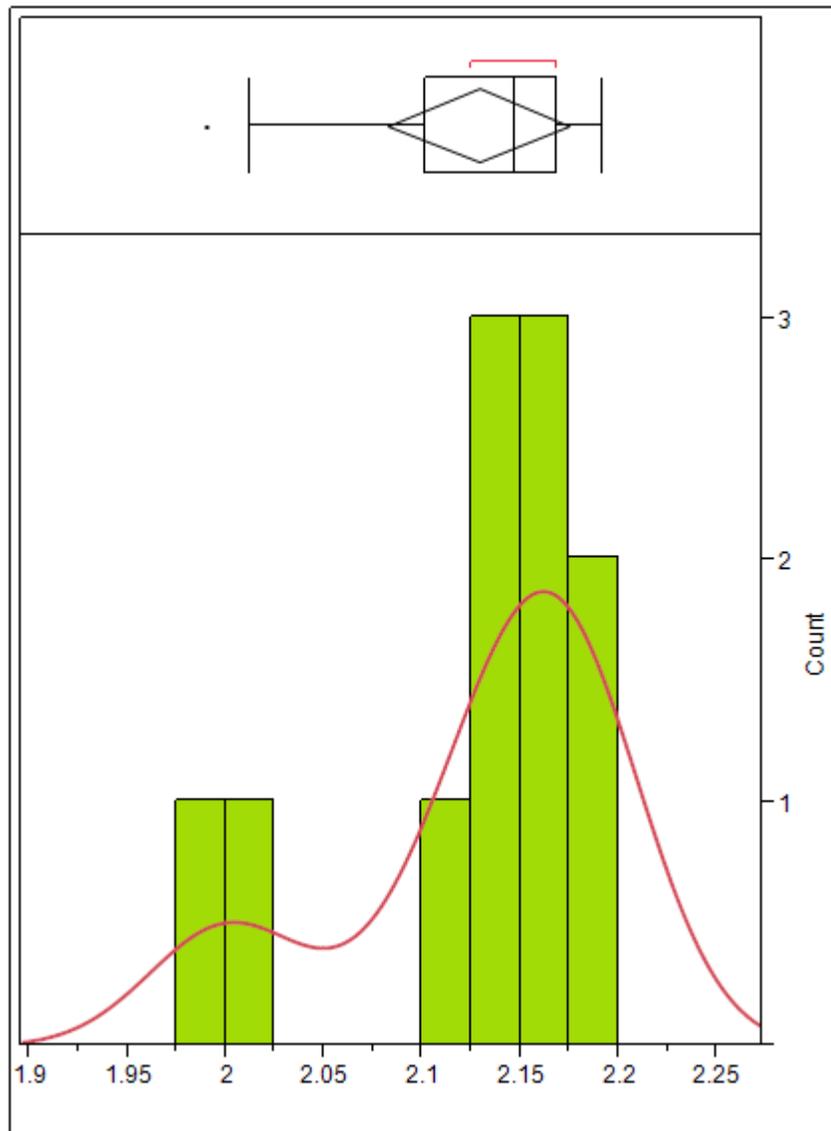


Figura 4. Resultados del análisis de antioxidantes totales en los controles.

5.4 Efecto del Sexo sobre la Cantidad de AOT

Los valores de AOT en mujeres oscilaron entre 1.27 y 2.19 mmol/L con un promedio de 1.99 ± 0.69 mmol/L, mientras que en los hombres los valores estuvieron en un intervalo de 2.0 a 2.14 mmol/L.

El análisis de varianza mostró que no existe una diferencia significativa ($P < 0.05$) en los valores de AOT entre el género masculino y femenino como se muestra en la Figura 5.

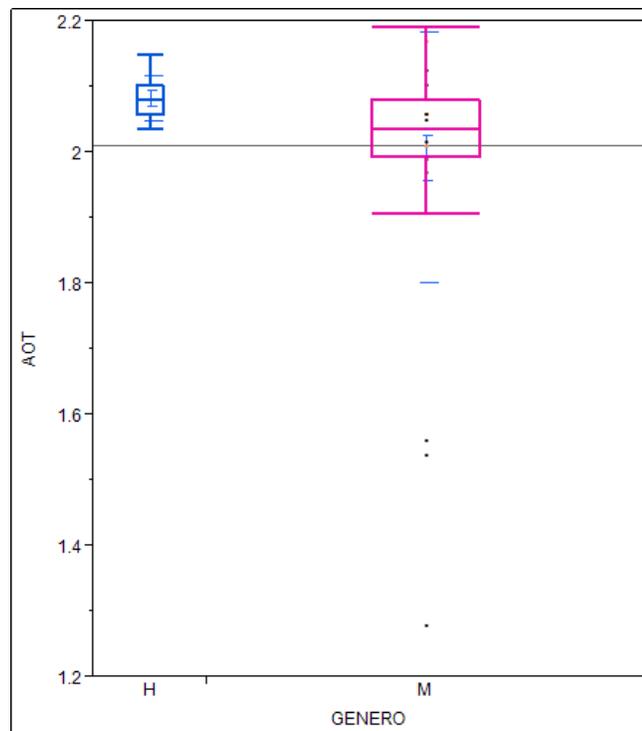


Figura 5. Prueba de medias entre la cantidad de AOT para los géneros analizados

5.5 Efecto de la edad sobre el contenido de AOT en los controles

Primeramente se realizó un análisis de correlación del contenido de AOT contra la edad. Se encontró que los valores de AOT controles disminuyen ligeramente con respecto a la edad de las personas como se muestra en la Figura 6A. El modelo que correlaciona el contenido de AOT con la edad de los controles es :

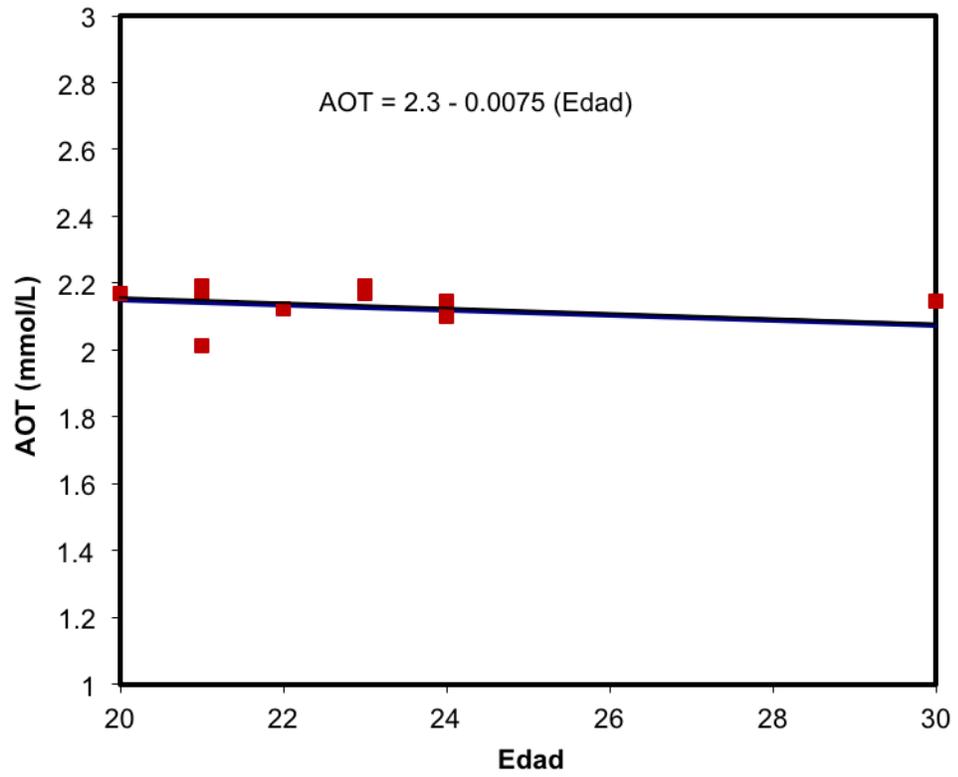
$$AOT \left(\frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right) = 2.3 - 0.0075 (\text{Edad})$$

Se definió el término de Índice Oxidativo (I_{ox}) de la siguiente forma:

$$I_{ox} (\%) = \frac{AOT_{\text{max}} - AOT_{\text{actual}}}{AOT_{\text{max}}} \times 100$$

Donde: AOT_{max} es el valor de antioxidante máximo que se encontró en los controles el cual corresponde a 2.3 mmol/L; AOT_{actual} es el resultado del análisis. Por lo que el término I_{ox} representará el estado de oxidación actual, con respecto a un valor máximo de los controles. De esta forma se calculó el estado oxidativo de los controles y se encontró que existe una buena correlación con la edad (Figura 6B)

A. Relación del contenido de AOT con la edad



B. Correlacion de la Edad contra el I_{ox} de todos los Controles

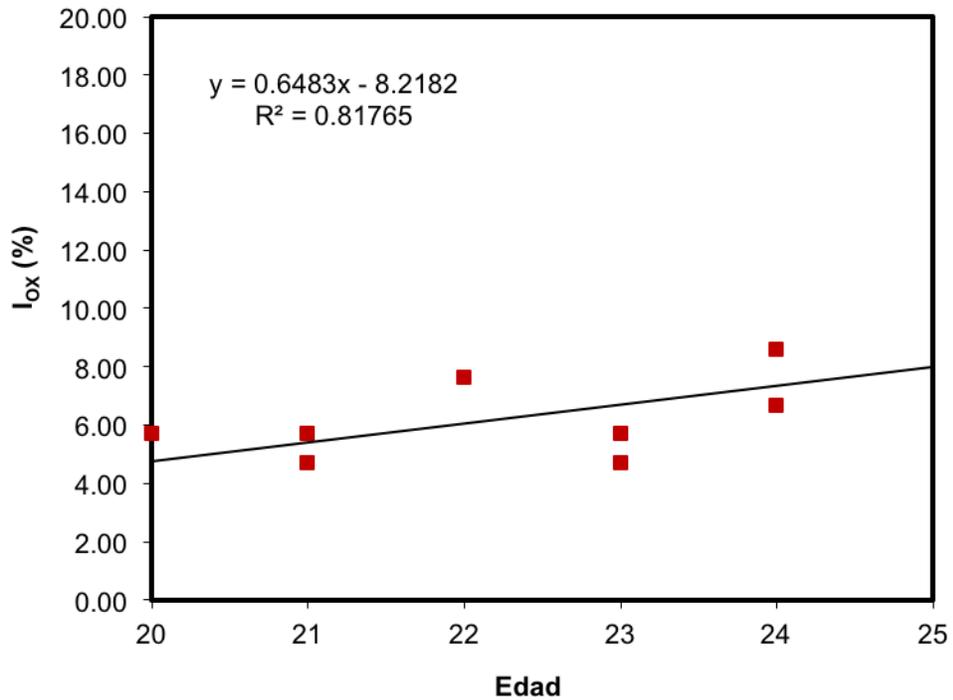


Figura 6. Correlación de la cantidad de AOT en los controles con la edad.

De esta forma será posible predecir el I_{ox} en función de la edad de acuerdo a la expresión siguiente:

$$I_{ox} (\%) = 0.65 (\text{edad}) - 8.2$$

Tomando en cuenta esta expresión se obtuvo la siguiente simulación del índice oxidativo dependiendo de la edad de la persona (Figura 7).

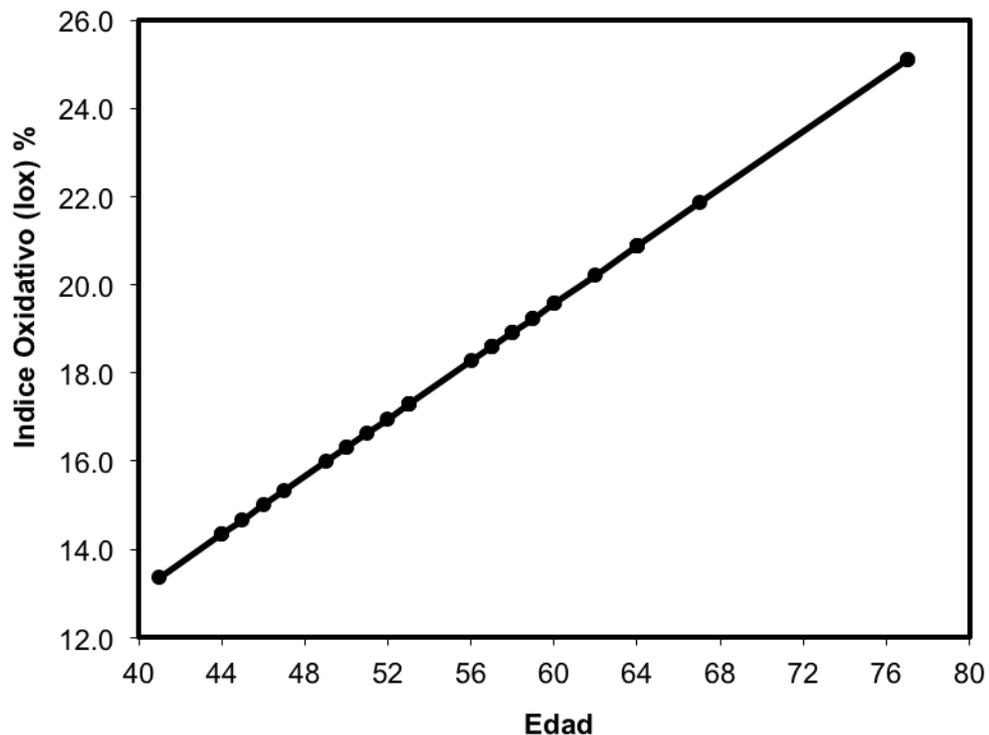


Figura 7. Índice oxidativo como una función de la edad de la persona.

5.6 Comparación de medias

Para un mejor análisis de los datos de contenido de AOT se decidió hacer un bloqueo por intervalos de 5 años edad y los valores se compararon con los datos de los controles. Los datos control fue asignado con el código 0; y los grupos de edad se muestran en la Tabla 1. Al analizar todos los pares de medias por medio de una prueba *t* de student se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los grupos de edades 41-45 años bloque (2) con edades desde 46 hasta 60 años, así como con el grupo control. Lo cual implica

que los valores de AOT más bajos obtenidos se encontraron en este grupo de edades (41-45 años). De la misma manera el grupo de 61-65 años de edad también presentó diferencias significativas con el grupo control y los grupos del 3 al 5.

Tabla 1. Resultados de la prueba *t* de student entre pares de media.

Bloque	Edades	AOT_{prom}
0	Control	2.156 ^a
1	36-40	2.103 ^{abc}
8	71-75	2.091 ^{abc}
5	56-60	2.064 ^a
4	51-55	2.040 ^{ab}
3	46-50	2.022 ^{ab}
7	65-70	1.993 ^{abc}
6	61-65	1.855 ^{bc}
2	41-45	1.841 ^c

Las valores con diferente superíndice son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$).

La Figura 8 muestra los resultados de la comparación de medias con el control por el método de Dunnett. Se encontró que solamente el grupo de edades de 41-45 años (bloque 2) y el de 61-65 años (bloque 6) son significativamente diferentes al grupo control (bloque 0).

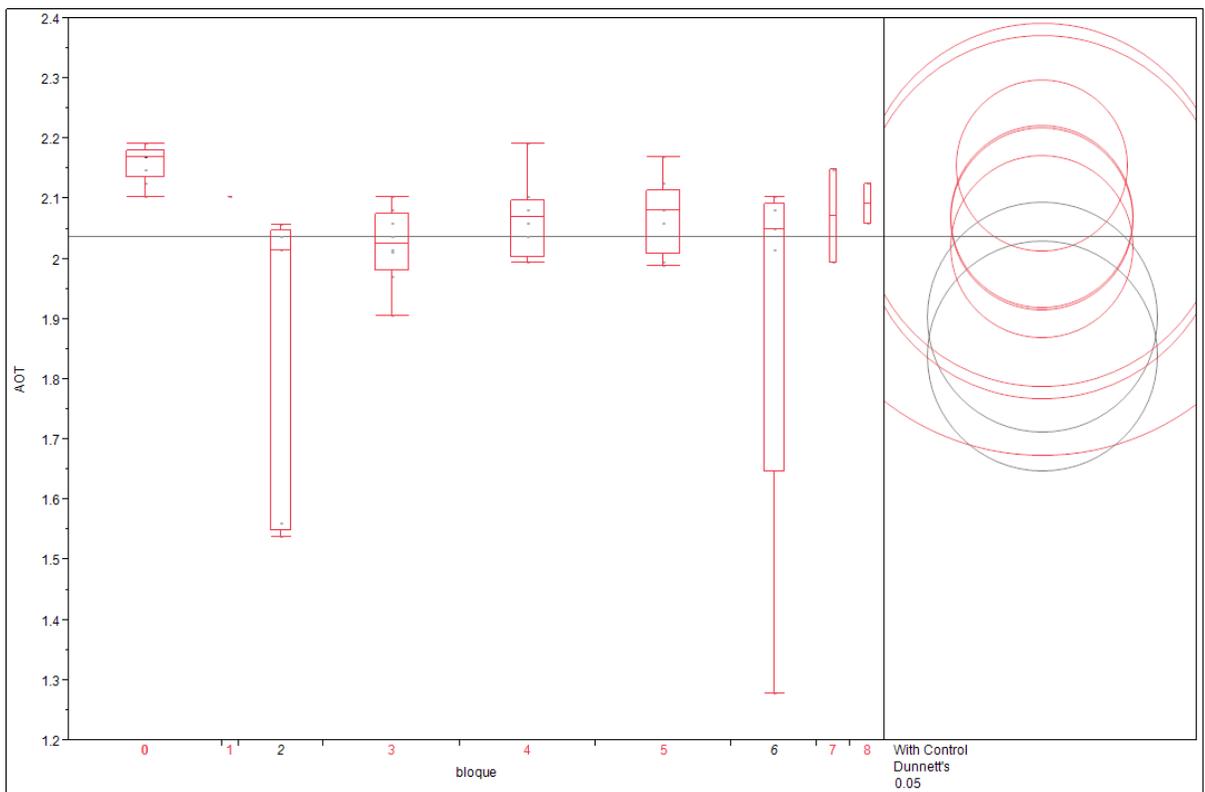


Figura 8. Comparación de medias Dunnet con los valores control.

En la Tabla 2 se resumen los valores de la prueba de Dunnett para las comparaciones de los valores de AOT promedios entre los diferentes grupos con el control. Solamente los bloques 6 y 2 presentaron diferencia significativa ($P>0.05$) con el control.

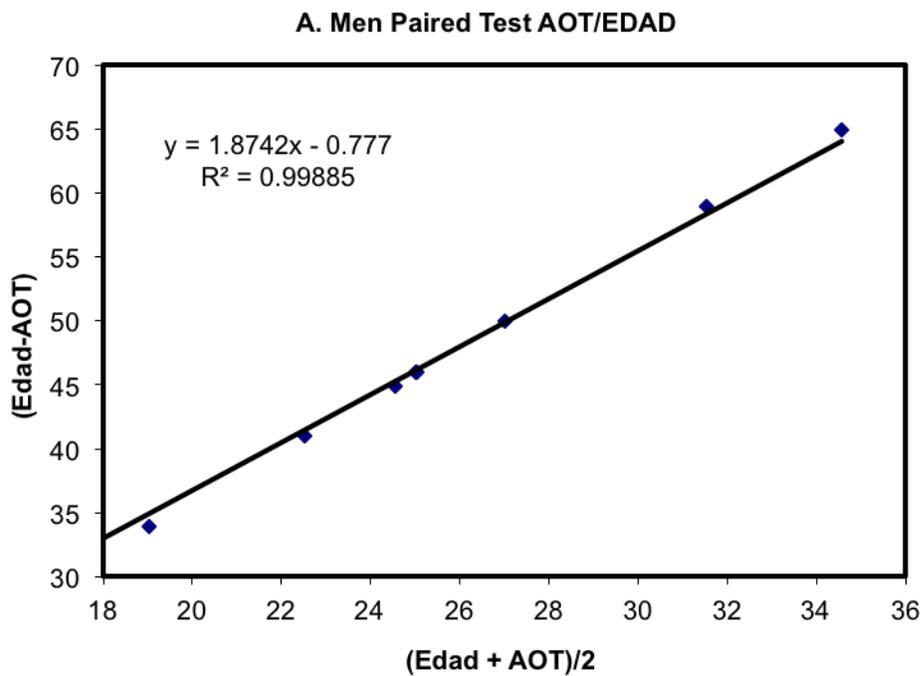
Tabla 2. Resultados de la prueba de medias con el control de Dunnett.

Bloque	Edades	AOT_{prom}	Abs (dif) – LSD	Valor P
0	Control	2.156	-0.201	1.0000
1	35-40	2.103	-0.396	0.9999
8	71-75	2.091	-0.268	0.9976
5	56-60	2.071	-0.122	0.8474
7	65-70	2.070	-0.247	0.9858
4	51-55	2.066	-0.117	0.8079
3	46-50	2.022	-0.072	0.3889
6	61-65	1.905	0.013	0.0336*
2	41-45	1.841	0.077	0.0043*

5.7 Efecto del Sexo y edad en el contenido de AOT

Debido a la diferencia tan pequeña entre los valores del contenido de AOT entre las muestras analizadas se decidió realizar un análisis de muestras

apareadas. En este caso se definió como variable dependiente a la diferencia entre la Edad y el valor de AOT y se correlacionó con el promedio de estos dos valores $((\text{Edad} + \text{AOT})/2)$. Se encontró una excelente correlación lineal ($R^2 > 0.99$) tanto para el análisis en hombres como en mujeres (Figura 8). Los valores de los parámetros para ambos sexos no difieren entre si.



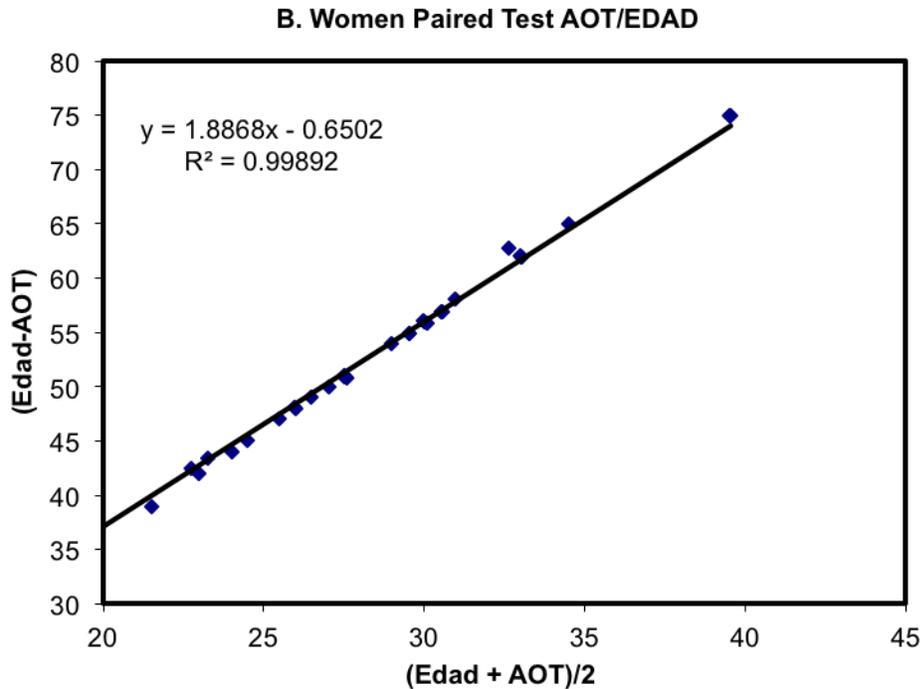


Figura 9. Prueba de media apareada para el contenido de AOT y la edad

De estas correlaciones se pudo obtener una expresión matemática para determinar el contenido de AOT dependiendo la edad de la persona de la siguiente forma:

$$AOT \left(\frac{mmol}{L} \right) = 0.03 (edad) + 0.335$$

Con esta ecuación se compararon los valores analizados en las personas y el predicho por este modelo y se encontró una excelente aproximación. La distribución de los errores se graficó y se obtuvo una distribución normal con media igual a cero y desviación de 0.3, la cual se muestra en la Figura 10.

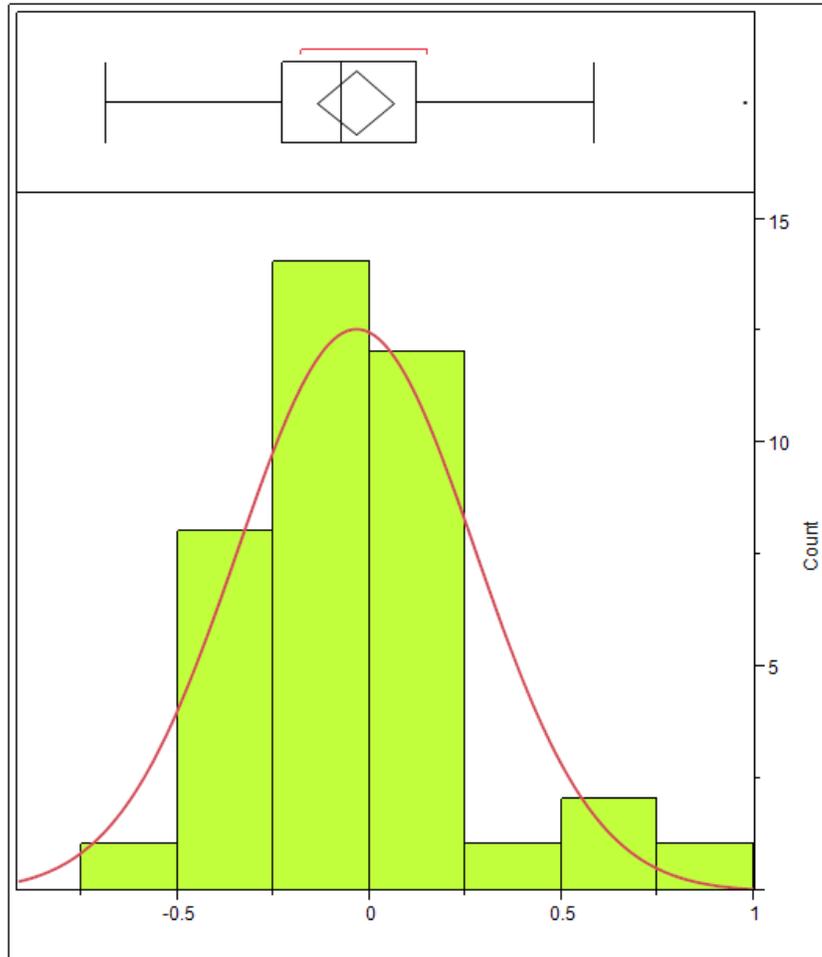


Figura 10. Distribución de los errores entre los valores predichos y los resultados analíticos de AOT

6.-CONCLUSIONES

Estudios epidemiológicos han mostrado una disminución de la incidencia de enfermedades cardiovasculares en personas con suplementación antioxidante, donde las vitaminas E y el Beta caroteno disminuyen el riesgo de accidentes fatales. Otros estudios han revelado que la incidencia de enfermedades coronarias es inversamente proporcional al consumo de vitaminas A, E y Beta caroteno. En estudios realizados sobre el efecto de la peroxidación lipídica y el estado antioxidante en la arterosclerosis se encontró que bajos niveles de antioxidantes y la peroxidación lipídica están involucrados en las fases tempranas del proceso aterosclerótico²⁰.

De acuerdo con el estudio estadístico realizado, se encontró que se analizaron los resultados del análisis de sangre de 8 hombres y 31 mujeres de edades de 36 a 77 años de edad. Entre los pacientes la edad se distribuyó en forma normal como se muestra en la Figura 1, con una edad promedio de 55 años y desviación típica de 9 años. De acuerdo al diagrama de Tuckey se observa que el 50% de la muestra tenía de 48 a 60 años de edad, para el control (Figura 2) se escogieron 11 personas sanas entre los 23 a 30 años de edad, resultando un promedio de 23 ± 4 años de edad.

Los valores de AOT en mujeres oscilaron entre 1.27 y 2.19 mmol/L con un promedio de 1.99 ± 0.69 mmol/L, mientras que en los hombres los valores estuvieron en un intervalo de 2.0 a 2.14 mmol/L, para el caso de los controles se encontró que el valor mas alto fue de 2.3 mmol/L, el cual disminuye ligeramente con la edad de la persona, para el grupo problema los valores de AOT más bajos obtenidos se encontraron en este grupo de edades 41-45 años. De la misma manera el grupo de 61-65 años de edad también presentó diferencias significativas con el grupo control, una vez obtenida la correlacion

lineal se encontró que los valores de los parámetros para ambos sexos no difieren entre sí.

Por lo tanto, se concluye que los valores promedio del Estado Antioxidante Total encontrados en el grupo de estudio son relativamente bajos comparados con los niveles normales, esto es debido a una suplementación dietaria insuficiente, al consumo en hasta 3 veces por semana de carnes rojas, pocas frutas y verduras, algunas complicaciones como obesidad, hipertensión arterial, altos niveles de colesterol y triglicéridos, pie diabético, en algunos de los casos ya se padece de neuropatía diabética la cual no es atendida como se debe.

Con el presente estudio se pretende determinar que en personas diabéticas los niveles del Estado Antioxidante Total es bajo y por lo tanto, se deben suplementar a estas personas con antioxidantes siempre y cuando sea en la dosis necesaria para no afectar su metabolismo y así poder evitar la presencia de neuropatía diabética ya que por lo regular es lo que hace ver a estas personas cansadas y deterioradas y por supuesto mantener sus niveles de glucosa dentro de los rangos normales.

7.-RECOMENDACIONES

Con estos hallazgos, se sugiere por una parte, proponer a los profesionales de la salud la administración de antioxidantes como terapia alternativa coadyuvante, para contrarrestar el daño que ocasionan los RL a las macromoléculas en aquellos pacientes que padecen alguna enfermedad crónico-degenerativa. Esto es con la finalidad de mejorar la calidad de vida de estos individuos o en su defecto para ayudar a prevenir y/o retardar la enfermedad, la cual se conoce esta estrechamente vinculada con el EOX.

Y por otra parte es importante hacer énfasis en el cuidado que se deberá tener al elegir qué tipo y la dosis adecuada del antioxidante que se prescribirá al paciente, la cual deberá ser de acuerdo a las necesidades muy particulares de éste. Pues de lo contrario, el(los) antioxidante(s) prescrito(s) podría(n) actuar como pro-oxidante, lo que provocaría estragos en la células. Por lo tanto, es de vital importancia que las nuevas investigaciones estén más enfocadas sobre este tema, ya que el día que se logre derribar la barrera de contradicciones que existen a este respecto (de si prescribir o no antioxidantes, de qué tipo y a qué dosis), pero sobre todo el informar y educar adecuadamente a la población sobre este tema, se habrá logrado un gran avance en la ciencia médica, al mismo tiempo que se habrá librado a la humanidad de seguir siendo engañados por “charlatanes” que dicen tener la solución a todas las enfermedades en un frasco de cápsulas “milagrosas”¹¹.

8.- BIBLIOGRAFÍA

1. Beristain-Pérez, A; Sánchez-Rodríguez, M; Ruíz-Ramos, M; Mendoza Núñez, V. 2006. Estrés Oxidativo Como Factor de Riesgo Para el Desarrollo de Diabetes Mellitus, Osteoartritis o Hipertensión Arterial en Adultos Mayores. Rev. Bioquímica Clínica, Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica. Vol. 31: número 001, pp. 13-22.
2. Boveris, A. 2005. La evolución del Concepto de Radicales Libres en Biología y Medicina. Ars Pharm. Vol. 46: número 001, pp. 85-95.
3. Céspedes-Cabrera, T; Sánchez-Serrano, D. 2000. Algunos Aspectos Sobre el Estrés Oxidativo, el Estado Antioxidante y la Terapia de Suplementación. Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. Rev. Cubana Cardiol. Vol. 14: número 001, pp. 55-60.
4. Clapés-Hernández, S. 2000. Diabetes Mellitus, Estrés Oxidativo y Embarazo. Rev. Cubana Invest. Biomed. Vol. 19: número 003, pp. 191-195.
5. Clapés, S; Torres, O; Companioni, M; Villariño, U; Félix, B; Ela, M. 2001. Peroxidación Lipídica y Otros Indicadores de Estrés Oxidativo en Pacientes Diabéticos. Rev. Cubana Invest. Biomed. Vol. 20: número 002, pp. 93-98.
6. Danbara, et al. 2004. Oncology Reports. Vol. 12: número 005, pp. 1079-1085.
7. De la Torre-Binmelis, R. 1994. Determinación de la Actividad de Superóxido Dismutasa en Poblaciones Humanas Normales o Patológicas. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia. Madrid.
8. Guerra, M; Avarado, M; Librada, D; Torres, A. 2005. Relación Entre la Hemoglobina Glicosilada, Antioxidantes Totales y la Actividad de las

Enzimas Antioxidantes Superóxido Dismutasa (SOD) y Glutati6n Peroxidasa (GPX) en Pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 2 Controlados y no Controlados en Bogot6. Rev. De la Facultad de Ci6ncias, Pontificia Universidad Javeriana Bogot6. Vol. 10, pp. 91-97.

9. Mart6nez-Abundis, E; S6nchez-Rodr6guez, M; Hafidi-Betlakder, M. 2005. Participaci6n de la Mitocondria en el Desarrollo de Estr6s Oxidativo en la Obesidad. Rev. Bioqu6mica Cl6nica, Asociaci6n Mexicana de Bioqu6mica Cl6nica. Vol. 30: n6mero 003, pp. 82-89.
10. Mart6nez-Conde, A; Paredes-Fern6ndez, C; Castillo, R. 2002. Neuropat6a Diab6tica. Rev. Medicina Interna, Hospital General Dr. Gea Gonz6lez. Vol. 5: n6mero 007, pp. 7-13.
11. P6rez- Gastell, P; P6rez de Alejo, J.2005. M6todos Para Medir el Da6o Oxidativo. Rev. Cubana Med. Milit. Vol. 29: N6mero 003, pp. 192-198.
12. P6rez-P6rez, L. 2000. Estr6s Oxidativo: La Paradoja del Ox6geno. Rev. Cubana Endocrinolog6a. Vol. II: n6mero 003, pp. 139-142.
13. Radicales Libres . http://es.wikipedia.org/wiki/Radical_libre#columnone (accesado 14 de Noviembre 2007, 05:14 P.M.)
14. Ram6rez-Delgado, J. 2004. Neuropat6a Diab6tica y su tratamiento. Foro de Investigaci6n y Tratamiento del Dolor Para la Comunidad M6dica. Endocrinolog6a, Pp. 5-9.
15. Ramos-Ibarra, M; Batista-Gonz6lez, C; G6mez-Meda, B; Zamora-P6rez, A. 2006. Diabetes, Estr6s Oxidativo y Antioxidantes. Investigaci6n en Salud, Universidad de Guadalajara. Vol. VIII: n6mero 001, pp. 7-15.
16. RANDOX TAS ANTIOXIDANTES (totales). <http://www.randox.com/spanish/about.cfm> (accesado 15 de Noviembre 2007, 04:30 P.M.).

17. Rodríguez, M; Menéndez, R; Trujillo, Y. 2001. Radicales Libres en la Biomedicina y Estrés Oxidativo. Rev. Cubana Med. Milit. Vol. 30: número 001, pp. 36-44.
18. Seclen, S; Barace, M; Mohama-Berrenechea, S. 2006. Antioxidantes en Poblaciones Adultas del Nivel del Mar y de Grandes Alturas: Actividad de la Superóxido Dismutasa. Rev. Med. Hered, pp. 17-24.
19. Shaw, J. 2006. Síndrome Metabólico y Epidemia Cardiovascular. Diabetes voice. Vol. 51, pp.26-27.
20. Thornton-Morrison, R; Neilson-Boyd, R. 1998. Química Orgánica; Quinta Edición Naucalpan de Juárez, México D.F.; pp. 46-50.
21. Waris, G; Ahsan, H. 2006. Reactive Oxygen Species: Role in the development of Cancer and various Chronic Conditions. Journal of carcinogenesis, Vol. 5, pp. 14.

9. ANEXOS

9.1 Preparación de reactivos

El kit TAS ANTIOXIDANTES (Totales) Método Randox tiene los siguientes componentes:

- 1.- Tampón: Fosfato Salino de 80mmol/L, pH 7.4.
- 2.- Cromógeno: Metamioglobina 6.1 μ mol/L, ABTS[®] 610 μ mol/L.
- 3.- Sustrato: Peróxido de hidrógeno (forma estabilizada) 250 μ mol/L.
- 4.- Patrón: Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromán-2-carboxílico Lote específico.

A continuación se muestra el procedimiento para la preparación de dichos reactivos:

1. Tampón: listo para usar. Estable hasta la fecha de caducidad cuando se conserva entre +2 y +8°C.
2. Cromógeno: Reconstruir un vial de cromógeno 2 con 10 mL de tampón 1. Estable dos días cuando se conserva entre +2 y +8°C u 8 horas entre +15 y +25°C.
3. Sustrato: Diluir 1 mL de sustrato 3 con 1.5 mL de tampón 1. Estable 24 horas cuando se conserva entre +2 y +8°C.

En la forma no diluida es estable hasta la fecha de caducidad cuando se conserva entre +2 y +8°C.

4. Patrón: Reconstruir un vial de patrón con 1ml de agua doblemente desionizada. Estable durante 2 días, cuando se conserva entre +2 y +8°C ó, 1 mes a -20°C.

Nota: Si este análisis se utiliza en un sistema automatizado, por favor, referirse a la hoja de procedimientos para ese sistema, ya que las instrucciones de reconstitución podrían diferir.

9.2 Preparación del suero control

El suero control ó control de calidad es humano original y fabricado por Randox, está compuesto por ácido 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromán-2-carboxílico a una concentración de 243 NX = 2.08 mmol/L.

Se abre el frasco muy cuidadosamente evitando cualquier pérdida de material y se reconstituye en exactamente 5 mL de agua destilada a una temperatura de 20-25°C, se tapa y se deja reposar 30 minutos.

9.3 Reactivos

Componentes	Concentraciones en la prueba	$\mu\text{mol/L}$
1. Tampón		
Tampón Fosfato salino		80 nmol/L, pH 7.4
2. Cromógeno		
Metamioglobina		6.1
ABTS ^R		610
3. Sustrato		
Peróxido de Hidrógeno (forma estabilizada)		250
4. Patrón		
Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico		Lote específico

9.4 Procedimiento

Condiciones del análisis

Longitud de onda	600 nm
Cubeta	1 cm de espesor
Temperatura	37°C
Medición	Frente al aire

Pipetear en cubetas:

Reactivo	Blanco	Patrón	Muestra
Agua bidestilada (μL)	20	—	—
Patrón (μL)	—	20	—
Muestra (μL)	—	—	20
Cromógeno (mL)	1	1	1

Mezclar bien y leer la absorbancia inicial (A_1).

Añadir:

Sustrato (μl)	200	200	200
----------------------------	-----	-----	-----

Mezclar y empezar a cronometrar simultáneamente. Leer absorbancia: (A_2) al cabo de exactamente 3 minutos.

$A_2 - A_1 = \Delta A$ de muestra/patrón/blanco.

Cálculo:

Estado de los antioxidantes totales:

Factor = concentración del patrón / (ΔA blanco – ΔA patrón)

Mmol/l = factor * (ΔA blanco – ΔA muestra)¹⁵.

9.5 Entrevista realizada al grupo de estudio

1. Nombre del paciente.
2. Edad.
3. Lugar donde vive.
4. Tiempo padeciendo diabetes mellitus tipo 2.
5. Niveles de glucosa en los últimos 3 meses.
6. Tipo de control de glucosa.
7. Dolor en huesos y articulaciones.
8. Consume frutas, verduras, carnes, pescado, harinas.
9. ¿Con qué frecuencia?
10. ¿Toma complementos vitamínicos?
11. ¿Qué vitaminas?
12. Complicaciones.
13. Valores de presión arterial.